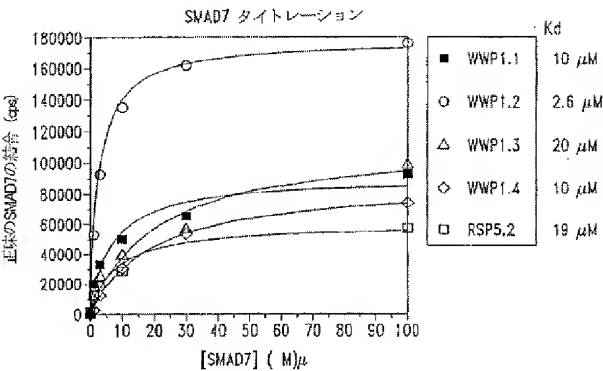


(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 29/00		A 6 1 P 29/00	
35/00		35/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 73 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2001-520108(P2001-520108)	(71)出願人	シグナル ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サン ディエゴ, オバーリン ドライ ブ 5555
(86) (22)出願日	平成12年8月29日(2000.8.29)	(72)発明者	ホークストラ, マール, エフ. アメリカ合衆国 92007 カリフォルニア 州, カーディフ-パイパー-シー, マンチ ェスター アヴェニュー 2361
(85)翻訳文提出日	平成14年2月28日(2002.2.28)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 2 3 7 2 9		
(87)国際公開番号	W O 0 1 / 0 1 6 6 0 4		
(87)国際公開日	平成13年3月8日(2001.3.8)		
(31)優先権主張番号	0 9 / 3 8 5 , 9 1 8		
(32)優先日	平成11年8月30日(1999.8.30)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 T G F - ベータ細胞シグナリングをモジュレートする薬剤のスクリーニング

(57)【要約】  
トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF-β) および骨形成タンパク質 (BMP) などのTGF-βファミリーのメンバーが仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤を同定する方法を提供する。そのような薬剤は、候補薬剤を評価するスクリーニングを利用してSmadタンパク質分解をモジュレートする能力を同定することができる。本明細書に記載のように同定された薬剤を使用して、様々な細胞型において、治療目的のために、1以上のTGF-βファミリーメンバーが仲介するシグナリングを増強または阻害することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $TGF\beta$  および／またはBMPが仲介するシグナリングを調節する薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)(i)HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメイン、またはポリペプチドのSmadタンパク質と結合する能力がHECT E3ユビキチンリガーゼと比較して実質的に減少していないその変異体を、含んでなる第1のポリペプチド；

(ii)Smad PYモチーフ、またはポリペプチドのE3ユビキチンリガーゼと結合する能力がPYモチーフを含む天然のSmadタンパク質と比較して実質的に減少していないその変異体を、含んでなる第2のポリペプチド；および

(iii)候補薬剤を、候補薬剤の不存在下で第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの検出可能なレベルの結合を可能にする条件下で接触させるステップ；

(b)第1のポリペプチドの第2のポリペプチドとの結合のレベルを決定するステップ；および

(c)その結合レベルを、候補薬剤の不存在下での第1のポリペプチドの第2のポリペプチドとの結合の対照レベルと比較して、その結果から候補薬剤が $TGF\beta$  および／またはBMPが仲介するシグナリングをモジュレートするかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項2】 HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインが、配列 GPLPXQWEX<sub>3</sub> tttGtXYYhXHNTtTTtWXtPt (配列番号2)

【配列中、<sub>3</sub>は極性アミノ酸残基（例えば、S、H、P、D、E、TまたはY）から独立して選択され、hは疎水性残基（例えば、I、V、LまたはM）であり、そしてそれぞれのXは独立して選択されたアミノ酸残基である】を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 Smad PYモチーフが、配列 Ser/Thr-Pro-Pro-Pro-Pro/Ala/Gly-Tyr (配列番号15)（ここでSer/Thrはセリンもしくはトレオニンであるアミノ酸残基でありかつPro/Ala/Glyはプロリン、アラニンおよびグリシンからなる群から選択されるアミノ酸残基である）を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 Smad PYモチーフが、配列 TPPPAY (配列番号16) または TPPPGY (配列番号18) を含んでなる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 候補薬剤がコンビナトリアルライブラリー内の小分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 第1のポリペプチドが固体支持体上に固定されかつ第2のポリペプチドがタグを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 第2のポリペプチドが固体支持体上に固定されかつ第1のポリペプチドがタグを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 タグがビオチンもしくは放射性基である、請求項6または請求項7に記載の方法。

【請求項9】 結合のレベルを2抗体のサンドイッチアッセイを介して決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 結合のレベルを競合アッセイを経由して決定する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】  $TGF\beta$  および／またはBMPが仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)(i)候補薬剤；

(ii)ユビキチン化HECT E3ユビキチンリガーゼ；および

(iii)Smadタンパク質またはPYモチーフを含んでなるその変異体を、候補薬剤の不存在下でHECT E3ユビキチンリガーゼによるSmadタンパク質またはその変異体のユビキチン化を可能にする条件下で十分な時間の接触が行われるように、接触させるステップ；

(b)Smadタンパク質またはその変異体のユビキチン化のレベルを決定するステップ；および

(c)ユビキチン化のレベルを候補薬剤の不存在下でのユビキチン化の対照レベルと比較して、その結果から候補薬剤が $TGF\beta$  および／またはBMPが仲介するシグナリングをモジュレートするかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項12】 方法が共役ユビキチン化アッセイを含んでなる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 ユビキチン化HECT E3ユビキチンリガーゼが細胞抽出画分内に存在する、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 ユビキチン化のレベルをウェスタンブロット分析により決定する、請求項11に記載の方法。

【請求項15】 Smadタンパク質またはその変異体がタグを含んでなる、請求項11に記載の方法。

【請求項16】 BMPが仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)BMP受容体を発現する細胞を骨形成タンパク質および候補薬剤と接触させるステップ；および

(b)細胞中のSmadタンパク質のレベルを、候補薬剤の不存在下で骨形成タンパク質と接触させた細胞中のSmadタンパク質のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がBMPが仲介するシグナリングのモジュレーターであるかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項17】 Smadタンパク質がSmad1またはSmad5である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 細胞が骨細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項19】 細胞がニューロンまたは腎細胞である、請求項16に記載の方法。

【請求項20】 薬剤がBMPが仲介するシグナリングを増強する、請求項16に記載の方法。

【請求項21】 BMPが仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)BMP受容体を発現する細胞を骨形成タンパク質および候補薬剤と接触させるステップ；および

(b)細胞中のSmadタンパク質のユビキチン化のレベルを、骨形成タンパク質と接触させたが候補薬剤と接触させなかった細胞中のSmadタンパク質ユビキチン化のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がBMPが仲介するシグナリングをモジュレートするかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項22】 Smadタンパク質がSmad1またはSmad5である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 細胞が骨細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 細胞がニューロンまたは腎細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 薬剤がBMPが仲介するシグナリングを増強する、請求項21に記載の方法。

【請求項26】 TGF- $\beta$ が仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a) TGF $\beta$ 受容体を発現する細胞をTGF- $\beta$ および候補薬剤と接触させるステップ；  
および

(b) 細胞中のSmadタンパク質のレベルを、候補薬剤の不存在下で骨形成タンパク質と接触させた細胞中のSmadタンパク質のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がTGF- $\beta$ が仲介するシグナリングのモジュレーターであるかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項27】 Smadタンパク質がSmad2またはSmad3である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 薬剤がTGF- $\beta$ が仲介するシグナリングを増強する、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 TGF- $\beta$ が仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a) TGF $\beta$ 受容体を発現する細胞をTGF- $\beta$ および候補薬剤と接触させるステップ；  
および

(b) 細胞中のSmadタンパク質のユビキチン化のレベルを、骨形成タンパク質と接触させたが候補薬剤と接触させなかった細胞中のSmadタンパク質のユビキチン化のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がTGF- $\beta$ が仲介するシグナリングをモジュレートするかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項30】 Smadタンパク質がSmad2またはSmad3である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】 薬剤がTGF- $\beta$ が仲介するシグナリングを増強する、請求項29に記載の方法。

【請求項32】 BMPが仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)BMP受容体を発現する細胞を骨形成タンパク質および候補薬剤と接触させるステップ；および

(b)細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルを、候補薬剤の不存在下で骨形成タンパク質と接触させた細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がBMPが仲介するシグナリングをモジュレートするかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項33】 細胞が骨細胞である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 細胞がニューロンまたは腎細胞である、請求項32に記載の方法。

【請求項35】 薬剤がBMPが仲介するシグナリングを増強する、請求項32に記載の方法。

【請求項36】 TGF- $\beta$ が仲介するシグナリングをモジュレートする薬剤をスクリーニングする方法であって、

(a)TGF- $\beta$ 受容体を発現する細胞をTGF- $\beta$ および候補薬剤と接触させるステップ；および

(b)細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルを、候補薬剤の不存在下で骨形成タンパク質と接触させた細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルと比較して検出し、その結果から候補薬剤がTGF- $\beta$ が仲介するシグナリングを調節するかどうかを決定するステップを含んでなる前記方法。

【請求項37】 TGF- $\beta$ が仲介するシグナリングを増強する、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 細胞を、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害する薬剤と接触させることを含んでなる、細胞中のTGF- $\beta$ および／またはBMPが仲介するシグナリングを増強する方法。

【請求項39】 Smad PYモチーフが配列TPPPAY（配列番号16）を含んでなる、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 Smad PYモチーフが配列TPPPGY（配列番号18）を含んでな

る、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 細胞を、Smadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤と接触させることを含んでなる、細胞中のTGF- $\beta$ および／またはBMPが仲介するシグナリングを増強する方法

【請求項42】 Smadタンパク質がSmad1またはSmad5である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 Smadタンパク質がSmad2またはSmad3である、請求項41に記載の方法。

【請求項44】 HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、患者の骨形成を刺激する方法

【請求項45】 Smad PYモチーフが配列TPPPAY（配列番号16）を含んでなる、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 Smadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、患者の骨形成を刺激する方法

【請求項47】 Smadタンパク質がSmad1またはSmad5である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、不十分なTGF- $\beta$ および／またはBMPが仲介する細胞シグナリングに関連する症状を予防または治療する方法。

【請求項49】 Smad PYモチーフが配列TPPPAY（配列番号16）を含んでなる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 Smad PYモチーフが配列TPPPGY（配列番号17）を含んでなる、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 Smadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、不十分なTGF- $\beta$ またはBMPが仲介する細胞シグナリングに関連する症状を予防または治療する方法

【請求項52】 Smadタンパク質がSmad1またはSmad5である、請求項51に記

載の方法。

【請求項53】 Smadタンパク質がSmad2またはSmad3である、請求項51に記載の方法。

【請求項54】 症状が癌または炎症である、請求項48または請求項51に記載の方法。



## 【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は一般的に、トランスフォーミング成長因子ベータ ( $\text{TGF-}\beta$ ) および骨形成タンパク質 (BMP) などの $\text{TGF-}\beta$  ファミリーのメンバーが仲介するシグナリングを調節する薬剤を同定する方法に関する。本発明は、さらに特定すれば、薬剤をSmadタンパク質分解を調節する能力について評価するために利用するスクリーニング、およびそのような薬剤を利用して様々な細胞型においてBMPが仲介するシグナリングを増強もしくは阻害する方法に関する。

【0002】

発明の背景

トランスフォーミング成長因子ベータ ( $\text{TGF-}\beta$ ) スーパーファミリーは、細胞増殖、遊走、分化およびアポトーシスなどの様々な細胞機能を調節する多機能タンパク質の大きなファミリーである。 $\text{TGF-}\beta$  は $\text{TGF-}\beta$  ファミリーの基礎となるメンバーであって、胚パターン形成から成体組織における細胞成長調節までにわたり様々な役割を演じることがわかっている。 $\text{TGF-}\beta$  としては、最終的に特定遺伝子のセットの発現を活性化および/または抑制するシグナル伝達カスケードにより、その生物学的機能を果たす。他の $\text{TGF-}\beta$  ファミリーメンバーは、アクチビン、インヒビンおよび骨形成タンパク質 (BMP) が挙げられる。BMPが仲介するシグナル伝達は骨成長を含む様々な通常のプロセス、および神経系、眼および腎臓などの器官の機能にとって重要である。

【0003】

$\text{TGF-}\beta$  ファミリーメンバーは一般的に、最初に受容体と結合することによりシグナル伝達を開始する。例えば、 $\text{TGF-}\beta$  は最初にそのタイプII受容体と結合してそのシグナルをトリガーし、次いでタイプI受容体を補充して活性化する。活性化したタイプI受容体は次に、その細胞内シグナルトランスデューサー分子であるSmadタンパク質をリン酸化する (Heldinら, Nature 390:465-471, 1997; Derynckら, Cell 95:737-740, 1998)。同様に、BMPはBMPセリン／トレオニン膜貫通受容体プロテインキナーゼと結合する。それらのシグナルは、さらに受容体から

核へ伝達され、遺伝子発現のパターンの改変をもたらす。BMP受容体から核へのシグナル伝達にはSmadファミリータンパク質が関わり、ある特定のSmadファミリータンパク質は転写複合体中に組み込まれて下流遺伝子を活性化することがわかっている。

#### 【0004】

Smadは、受容体で活性化されるシグナル伝達転写因子であって、TGF- $\beta$ ファミリー受容体からのシグナルを伝達する。タンパク質のSmadファミリーのメンバーは、ショウジョウバエ (*Drosophila*) 遺伝子、dppに対するマザー (mad) との相同性に基づいて同定され、ショウジョウバエ dppシグナル伝達経路における必須エレメントをコードする (Sekeleskyら, *Genetics* 139:1347-1358, 1995; Newfeldら, *Development* 122:2099-2108, 1996を参照)。Smadタンパク質は一般的に、プロリンの豊富なリンカーにより分離されている高度に保存されたアミノおよびカルボキシ末端ドメインにより特徴づけられる。アミノ末端ドメイン (MH1ドメイン) はDNA結合に仲介し、そしてカルボキシ末端ドメイン (MH2ドメイン) は受容体に関連する。

#### 【0005】

これまで、8つのSmadタンパク質が同定され、TGF- $\beta$ ファミリーメンバーにより誘導されるシグナル応答に参加することが示されている (KretzschmarおよびMassague, *Current Opinion in Genetics and Development* 8: 103-111, 1998を参照)。これらのSmadは3つのサブグループに区分しうる。1つのグループ (Smad1、2、3、5および8) はTGF- $\beta$ ファミリー受容体キナーゼの直接基質であるSmadを含む。他のグループ (Smad4) は直接の受容体基質ではないが、受容体に活性化されるSmadに結合してシグナリングに参加するSmadを含む。Smadの第三のグループ (Smad6およびSmad7) は最初の2つのグループのSmadの活性化を阻害するタンパク質からなる。

#### 【0006】

Smadは様々なTGF- $\beta$ ファミリーメンバーの経路に特異的な役割を有する。TGF- $\beta$ ファミリーメンバーに対して同定されたSmadタンパク質の中で、Smad2およびSmad3はTGF- $\beta$ シグナリングに対して特異的である (Heldinら, *Nature* 390:465-4

71, 1997)。活性化したSmad2およびSmad3は共通のメディエーターSmad4と相互作用し、そして核に転位し、そこで、特定遺伝子のセットを活性化する (Heldinら, Nature 390:465-471, 1997)。TGF- $\beta$ 経路は、Smad2および/またはSmad3の直接活性化と共に、シグナル阻害タンパク質Smad6およびSmad7を利用してシグナリングの正味出力をバランスする。BMPが仲介するシグナリングの場合には、BMPがBMP受容体と結合した後、Smad1およびSmad5が受容体に補充されてリン酸化される。これらのタンパク質がリン酸化されると、Smad1とSmad5はSmad4と共に複合体を形成し、そして複合体は核へ転位し、BMPが仲介する遺伝子転写の活性化をもたらす。

#### 【0007】

Smad2とSmad3は転写因子として内因性トランス活性化活性を有する (Zawelら, Mol Cell 1:611-617, 1998) が、諸研究はこれらが主に他の核因子と特異的に相互作用することを通して特定遺伝子の発現を活性化することを実証している (Derynckら, Cell 95: 737-740, 1998)。所与の細胞型に対する特異的なTGF- $\beta$ が仲介する効果は、特定のSmadタンパク質を活性化することにより達成し、特定遺伝子の発現の改変をもたらすことができる。様々なシグナル伝達経路の相互作用 (interplay) またはクロストーク (crosstalk) は、所与の条件下で所与の細胞への全シグナルに対して均衡のとれたかつ統合された応答を与えるために必須である。TGF- $\beta$ が誘導するシグナリングは、SmadレベルでRasが仲介するMAPキナーゼ経路およびJak/Stat経路とクロストークすることが見出されている (Ulloaら, Nature 397: 710-3, 1999; Kretzschmarら, Nature 389: 618-22, 1997)。

#### 【0008】

以上述べたように、TGF- $\beta$ は細胞成長の調節に、ある役割を演じる。TGF- $\beta$ は、応答する細胞の型および/または成長段階に依存して、成長刺激因子または成長阻害因子でありうる。TGF- $\beta$ は、強力なネガティブ上皮細胞成長レギュレーターとして上皮の発癌に重要な役割を演じる (Cuiら, Cell. 86:531-542, 1996)。TGF- $\beta$ は、p15およびp21などのサイクリン依存性キナーゼインヒビターを誘導することにより細胞成長停止を起こすことが示されており (Hannonら, Genes Dev. 9:1831-45, 1995)、また、細胞をTGF- $\beta$ 耐性にするTGF- $\beta$ のタイプII受容体

突然変異は細胞の腫瘍化状態を亢進させる (Markowitzら, Science 268:1336-8, 1995)。Smad遺伝子の突然変異はまた癌とも関連している。複数の大腸癌は腫瘍抑制タンパク質Smad2が突然変異を保有することが見出されている (Eppertら, Cell 88:543-552, 1996; Hataら, Nature 388:82-87, 1997)。Smad4はヒト膵臓癌において腫瘍抑制遺伝子であり、そして恐らくは他の腫瘍においてもそうであることが示されている。Smad3突然変異マウスは転位性結腸直腸癌を発現し (Zhuら, Cell 94: 703-714, 1998)、Smad3がヒト大腸癌において、ある役割を演じることを示唆する。他の環境においては、TGF- $\beta$ とTGF- $\beta$ 経路メンバーが細胞成長を促進する役割を演じるようである。発癌の初期段階において、TGF- $\beta$ は腫瘍プロモーターとして作用することが報じられている。後期段階において、TGF- $\beta$ は悪性の進行を刺激しうる。最近、TGF- $\beta$ は器官移植後に悪性腫瘍を促進することに直接関与することが実証されている (Hojoら, Nature 397:530-534, 1999)。このように、TGF- $\beta$ は腫瘍細胞浸潤および転位を促進する可能性があり、TGF- $\beta$ シグナリングをモジュレートする方法は効果的な癌治療を開発する機会を提供しうる。

#### 【0009】

TGF- $\beta$ およびBMPが仲介するシグナリングのある特定の態様は理解されているが、このシグナリングを調節する治療薬の開発を進めるには、これらのシグナリング経路のさらなる知識が必要である。従って、当業界では、TGF- $\beta$ およびBMPが仲介するシグナリングの分子機構の理解の改善およびこのシグナリングをモジュレートする薬剤の開発を必要としている。本発明はこれらの必要性を満たしかつさらにその他の関係する利点を提供する。

#### 【0010】

##### 発明の概要

簡単に説明すると、本発明は、TGF- $\beta$ および／またはBMPなどのTGF- $\beta$ ファミリーの他のメンバーが仲介するシグナル伝達をモジュレートする薬剤を同定する方法を提供する。ある特定の態様においては、そのような方法は、(a)(i) HECT E3ユビキチンリガーゼ<sup>WW</sup>ドメイン、またはポリペプチドのSmadタンパク質と結合する能力がHECT E3ユビキチンリガーゼと比較して実質的に減少していないその

変異体を、含んでなる第1のポリペプチド；(ii)Smad PYモチーフ、またはポリペプチドのE3ユビキチンリガーゼと結合する能力がPYモチーフを含む天然のSmadタンパク質と比較して実質的に減少していないその変異体を、含んでなる第2のポリペプチド；および(iii)候補薬剤を接触させるステップであって、接触のステップが候補薬剤の不存在下で第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの検出可能なレベルの結合を可能にする条件下で実施されることを特徴とするステップ；(b)第1のポリペプチドの第2のポリペプチドとの結合のレベルを決定するステップ；および(c)その結合レベルを、候補薬剤の不存在下での第1のポリペプチドの第2のポリペプチドとの結合の対照レベルと比較するステップを含んでなる。

#### 【0011】

他の態様においては、そのような方法は、(a)(i)候補薬剤；(ii)ユビキチン化HECT E3ユビキチンリガーゼ；および(iii)Smadタンパク質またはPYモチーフを含んでなるその変異体を接触させるステップであって、接触のステップが候補薬剤の不存在下でHECT E3ユビキチンリガーゼによるSmadタンパク質またはその変異体のユビキチン化が認められる条件下でかつ十分な時間の接触が行われることを特徴とするステップ；(b)Smadタンパク質またはその変異体のユビキチン化のレベルを決定するステップ；および(c)ユビキチン化のレベルを候補薬剤の不存在下でのユビキチン化の対照レベルと比較するステップを含んでなる。

#### 【0012】

さらなる態様においては、そのような方法は、(a)TGF- $\beta$ またはBMP受容体を発現する細胞をBMPまたはTGF- $\beta$ 、および候補薬剤と接触させるステップ；および(b)骨細胞中のSmadタンパク質のレベルを、候補薬剤の不存在下で骨形成タンパク質と接触させた細胞中のSmadタンパク質のレベルと比較して、検出するステップを含んでなる。

#### 【0013】

なおさらなるそのような方法は、(a)TGF- $\beta$ またはBMP受容体を発現する細胞をTGF- $\beta$ またはBMPおよび候補薬剤と接触させるステップ；および(b)細胞中のSmadタンパク質のユビキチン化のレベルを、骨形成タンパク質と接触させたが候補薬剤と接触させなかった細胞中のSmadタンパク質ユビキチン化のレベルと比較して

、検出するステップを含んでなる。

【0014】

他のそのような態様においては、TGF- $\beta$  またはBMPが仲介するシグナリングをモデュレートする薬剤をスクリーニングする方法は、(a)TGF- $\beta$  またはBMP受容体を発現する細胞をTGF- $\beta$  またはBMPおよび候補薬剤と接触させるステップ；および(b)細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルを、候補薬剤の不存在下でTGF- $\beta$  またはBMPと接触させた細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性のレベルと比較して、検出するステップを含んでなる。

【0015】

本発明はさらに、他の態様においては、細胞を、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害しおよび／またはSmadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤と接触させることを含んでなる、細胞中のTGF- $\beta$  またはBMPが仲介するシグナリングを増強する方法を提供する。

【0016】

さらなる態様においては、本発明は、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害しおよび／またはSmadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、患者の骨形成を刺激する方法を提供する。

【0017】

本発明はさらに、他の態様においては、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad PYモチーフとの結合を阻害しおよび／またはSmadタンパク質のユビキチン化を阻害する薬剤の治療上有効な量を患者に投与することを含んでなる、不十分なTGF- $\beta$  またはBMPが仲介する細胞シグナリングに関連する症状を予防または治療する方法を提供する。

【0018】

本発明のこれらおよびその他の態様は、以下の詳細な説明および添付した図面を参照すると明白になるであろう。本明細書に開示された全ての参照文献は、ここに参照によりその全文がそれぞれ個々に組み入れられたのと同様に本明細書に組み入れられる。

## 【0019】

## 発明の詳細な説明

上記のように、本発明は一般的に、1以上のTGF- $\beta$ ファミリーのメンバー（たとえば、形質転換成長因子ベータ（TGF- $\beta$ ）または骨形成タンパク質（BMP））により仲介されるシグナリングをモジュレートする薬剤を同定するための方法、および上記の薬剤を治療の目的に用いる方法に関する。本明細書により提供される方法を用いて同定された薬剤は、一般的に細胞内部の特定のSmadタンパク質を標的とすることにより上記のシグナリングをモジュレートする。上記の薬剤は、細胞のTGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに対する応答を変えるための強力な方法を提供する。

## 【0020】

本発明は、部分的に、TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーにより仲介されるシグナリングが、ある種のSmadタンパク質（たとえば、BMPに対してはSmad1およびSmad5、TGF- $\beta$ に対してはSmad2およびSmad3）のユビキチンに仲介される分解により弱まるという発見に基づいている。ユビキチンに仲介される分解は、一般的に誘発（triggering）シグナリングに関与するTGF- $\beta$ ファミリーのメンバーにより誘導される。さらに、本発明の研究の過程で、WWドメインを含むHECT E3ユビキチンリガーゼがある種のSmadタンパク質中のPYモチーフに結合して、標的Smadのユビキチン化およびプロテアソームに仲介される分解をもたらすことが見いだされた。HECT E3 WWドメインとSmad PYモチーフの間の結合を阻害する薬剤は、一般的にSmadタンパク質の分解を阻害する（すなわち、Smadタンパク質を安定化する）ために用いられ、その結果、TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに仲介されるシグナリングが促進される。

## 【0021】

ユビキチンに仲介されるタンパク質分解は、ユビキチンコンジュゲート経路により制御される（図1）。この経路内で、ユビキチンカスケード中の酵素1（E1）へのユビキチンモノマーのATP依存トランスファーにより、選択的ユビキチン化が開始される。次いで、E1に結合したユビキチンはATPによって活性化されて、ユビキチン-AMP中間体を形成する。AMPはE1活性部位システインにより置き換え

られて、ユビキチンのカルボキシ末端とチオエステル結合を形成する。次に、E1により第2の活性化されたユビキチンが形成され、これによりE1が、その活性部位のシステインからユビキチン担体タンパク質(E2)の活性部位のシステインにユビキチンをトランスファーできるようにする。このトランスファーの間、ユビキチン化経路の多様性は開始および増幅を始める。最も大きな程度のユビキチン化カスケードの中の選択性は、選択された基質上でのユビキチントランスファー、連結反応および重合のレベルで生じる。この最終段階はユビキチンリガーゼ(E3)により仲介される。E2は、ユビキチンをその活性部位からE3ユビキチンリガーゼのシステインにトランスファーさせるか、E3に依存する方法で標的タンパク質にトランスファーさせるかのいずれかである。E3によるユビキチンの基質上へのトランスファーおよび連結反応の後に、ユビキチン化されたタンパク質は26Sプロテアソームによる分解の標的になる。プロテアソームに仲介されるタンパク質分解に対する選択性はユビキチンタグにより決定される。

#### 【0022】

本明細書において、HECT E3ユビキチンリガーゼは、触媒カルボキシ末端ドメイン内にHECT (E6カルボキシル末端と相同) 配列を含むE3ユビキチンリガーゼである。好ましいHECT配列は以下の共通配列を満たす。

#### 【0023】

(Y/F)X<sub>(2-3)</sub>YX<sub>(8-11)</sub>WFWXI(V/I/L)X<sub>5</sub>EX(K/R)X<sub>3</sub>(L/V)QF(V/L)TG(T/S)XRLP  
(L/V/M/A/I)XGFXXLX<sub>(4-10)</sub>IX<sub>(7-9)</sub>LPXXHTCFNXLDPXYXSX<sub>3</sub>(L/M)X<sub>2</sub>  
(R/K)LX<sub>2</sub>AIX<sub>(4-6)</sub>F

(配列番号1)

ここで、X<sub>i</sub>はいかなるアミノ酸でもよく、(Y/F)はYの方がFよりも好ましい。

#### 【0024】

E3ユビキチンリガーゼは、ユビキチンを特定の基質にトランスファーして、基質をプロテアソームに仲介される分解の標的にする、ユビキチン化カスケードのメンバーである。公知のHECT E3ユビキチンリガーゼには、たとえば、WWP1(Pirozziら、J. Biol. Chem 272:14611-16, 1997)、E6-関連タンパク質 (E6-AP; Huibregtseら、Mol. Cell. Biol. 13:775-84, 1993)、Rsp5 (Huibregtseら、Proc. N



atl. Acad. Sci. USA 92:2563-67, 1995)、およびNedd4 (Staubら、EMBO J. 15: 2371-80, 1996)が含まれる。他のHECT E3ユビキチンリガーゼは公知のタンパク質に対する配列の類似性および/またはHECT E3リガーゼの機能的特性の存在に基づいて同定される。配列の類似性を評価するためにさまざまな技術を用いることができる。そのような技術の1つは、配列データベース（たとえば、GenBank）の検索である。そのような検索は公知のプログラム（たとえば、NCBI BLAST検索）を用いて行うことができ、高レベルの配列同一性および/または類似性を示すタンパク質がHECT E3リガーゼの候補である。あるいは、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションを用いた技術は、HECT E3リガーゼの同定を容易にし得る。このような技術の中で、公知のHECT E3ユビキチンリガーゼ（またはその一部）を、配列をハイブリダイズするためにライブラリー（cDNAまたはゲノム）をスクリーニングするためのプローブとして用いる。好ましい低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件としては、 $1.0\times$  SSPEまたはSSC、0.1% SDS、50℃が挙げられるが、これに限定されない。配列類似性を評価するためのさらに別の技術は、保存された配列をコードする縮重プライマーを用いて行うPCR反応を用いる。

#### 【0025】

別の方法として、またはこれに加えて、機能アッセイを、HECT E3ユビキチンリガーゼを同定するために用いることができる。ある種のアッセイは、Smadタンパク質またはその一部（たとえば、本明細書に記載されるようなPYモチーフを含む部分）のような基質への結合を検出する。このようなアッセイは当業者に公知であり、アフィニティー精製、酵母2ハイブリッドスクリーニングおよびファージディスプレイライブラリーのスクリーニングが挙げられる。これらおよび他の結合アッセイを実施する方法は特許および科学文献中に十分に記載されている（たとえば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1989; BrachmanおよびBoeke, Current Opinion in Biotechnology 8:5661-568, 1997; およびこれらの中で引用された参考文献）。他の機能アッセイをHECT E3ユビキチンリガーゼ候補のユビキチントランスファー活性を評価するように設計することができる。このよ

うなアッセイは、下により詳細に記載するように、公知の技術（たとえば、カップリングユビキチンアッセイ、またはユビキチンの基質へのトランスファーに対するE3の活性が基質タンパク質分解の測定と一致するようなユビキチン依存タンパク質分解アッセイ）を用いて実施される。HECT E3ユビキチンリガーゼはこのようなアッセイの中で検出可能なユビキチントランスファー活性を示さなければならない。

#### 【0026】

Smadタンパク質は公知のSmadタンパク質と相同であり（すなわち、MH2ドメイン中で少なくとも50%の一次配列の同一性を示す）、TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーにより仲介されるシグナル伝達に参与するタンパク質である（すなわち、特定のTGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに適したいずれかのアッセイを用いて測定した時、Smadタンパク質の発現により、上記のシグナル伝達を検出可能な程度に促進または阻害する）。特に興味深いSmadタンパク質には、Smad1 (Hoodlessら、Cell 89:1165-1173, 1996)、Smad2 (Nakaoら、J. Biol. Chem. 272:2896-2900, 1997)、Smad3 (Zhangら、Nature 383:168-172, 1996)、Smad5 (Liuら、Nature 381:620-623, 1996)、Smad6 (Imamuraら、Nature 389:622-626, 1997)およびSmad7 (Hayashiら、Cell 89:1165-1173, 1997)が含まれる。しかしながら、本明細書に記載されるようなPYモチーフを含むSmadタンパク質であればいずれも本発明の方法を用いて安定化されることは明らかである。

#### 【0027】

TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに仲介されるシグナリングをモジュレートする薬剤のアッセイ

TGF- $\beta$ および/またはBMPに仲介されるシグナリング、または1以上の他のTGF- $\beta$ ファミリーのメンバーにより仲介されるシグナリングをモジュレートする薬剤のスクリーニングアッセイは、さまざまな形、たとえば、細胞を基礎とするアッセイおよびin vitroのアッセイで行い得る。一般的に、このようなアッセイは、(1) HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインのSmad PYモチーフへの結合；(2) Smadタンパク質のE3ユビキチンリガーゼによるユビキチン化；(3) Smadタンパク質のタンパク質分解（たとえば、Smadタンパク質の細胞レベルの定量による）また

は(4) HECT E3ユビキチンリガーゼ活性に対する薬剤の作用を評価しなくてはならない。Smadタンパク質に関するアッセイでは、BMPに仲介されるシグナリングをモジュレートする薬剤は、Smad1またはSmad5（またはSmad1またはSmad5の変異体）の使用によって同定される。同様に、TGF- $\beta$ に仲介されるシグナリングをモジュレートする薬剤は、Smad2またはSmad3（またはSmad2またはSmad3の変異体）の使用により同定される。

#### 【0028】

本明細書に記載されるアッセイにおいてスクリーニングされる候補薬剤には、抗体およびその抗原結合断片、WWドメインまたはPYモチーフに相当する競合ペプチド、および、HECT E3ユビキチンリガーゼまたはSmadタンパク質に結合する小分子阻害剤のような他の天然または合成分子が含まれるが、これらに限定されない。候補薬剤はライブラリー（すなわち、化合物の集合）内に存在し得る。このような薬剤は、たとえば、発現ライブラリー内のDNA分子にコードされてもよい。このような他の薬剤には、 $10^5$ ダルトン未満、好ましくは $10^4$ ダルトン未満、さらに好ましくは $10^3$ ダルトン未満の分子量を有し、当技術分野で「小分子」として知られている化合物が含まれる。このような候補薬剤は、多数のあらかじめ決定された化学反応によって調製された合成物質（たとえば、ペプチド）を含むコンビナトリアルライブラリーのメンバーとして提供することができる。当業者には、上記のライブラリーの多様な組み合わせは確立された方法によって調製することができ、候補薬剤のライブラリーのメンバーを本明細書に記載する方法で同時にまたは逐次的にスクリーニングできることが理解されよう。

#### 【0029】

候補薬剤の、HECT E3ユビキチンリガーゼのSmadタンパク質への結合を阻害する能力についての迅速なスクリーニングのために、*in vitro*のアッセイを用いることができる。上記のように、本発明の研究の過程で、この結合は、HECT E3ユビキチンリガーゼのWWドメインと特定のSmadタンパク質のPYモチーフの間に生じることが見いだされた。従って、候補薬剤のこの相互作用に対する作用を評価する*in vitro*のアッセイのいずれかを用いて、TGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに仲介されるシグナリング（すなわち、TGF- $\beta$ 、BMP、アクチビンおよび/またはインヒ

ビンを含むTGF- $\beta$ ファミリーの1以上のメンバーに仲介されるシグナリング)をモジュレートする薬剤を同定できる。このようなアッセイは典型的には、HECT E3 WWドメインを含むポリペプチドまたはその変異体と、Smad PYモチーフを含むポリペプチドおよびその変異体との間の結合に対する薬剤の効果を評価する。

#### 【0030】

HECT E3 WWドメインは、本明細書において用いられる場合、20~22アミノ酸残基離れた2つのトリプトファン残基を含む (M. Sudol, Prog. Biophys. Molec. Biol. 65:113-132, 1996を参照されたい)、本明細書に記載される通りSmad PYモチーフに検出可能に結合するHECT E3ユビキチンリガーゼの領域である。好ましい実施形態において、WWドメインは下記の共通配列を満たす。

#### 【0031】

GPLPXQWEX<sub>3</sub> tttGtXYYhXHNTtTTtWXtPt (配列番号2)

ここで、それぞれのtは、独立に選択された極性のアミノ酸残基 (たとえば、S、H、P、D、E、TまたはY)、hは疎水性残基 (たとえば、I、V、LまたはM)であり、Xはいずれのアミノ酸でもよい。本明細書に記載されるこの配列、および他の配列の中で、アミノ酸残基は標準的な1文字または3文字のコードを用いて示されている。

#### 【0032】

代表的なHECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインには、SPLPPGWEERQDILGRYYVN HESRRTQWKRPTPDNL (ヒトNedd4; 配列番号3)、SGLPPGWEERQDILGRYYVN HESRRTQWKRPTPDNL (ヒトNedd4; 配列番号4)、GFLPKGWEVRHAPNGRPFFIDHNTKTTTWEDPRLK IPA (ヒトNedd4; 配列番号5)、GPLPPGWEERTHTDGRIFYINHNIKRTQWEDPRENVA (ヒトNedd4; 配列番号6)、GRLPPGWERRTDNFGRTYYVDHNTRTTTWKRPTLDQTE (酵母Rsp5; 配列番号7)、GELPSGWEQRFTPEGRAYFVDHNTRTTTWDP RRQYI (酵母Rsp5; 配列番号8)、GPLPSGWEMLTNTARVYFVDHNKTTTWDDPRLPSSL (酵母Rsp5; 配列番号9)、LPSGWGWEQRKDPHGRTYYVDHNTRTTTWERPQPLPPG (配列番号10; WWP1 WWドメイン1)、QPLPPGWERRVDDRRRVYVDHNTRTTTWQRPTMESVR (配列番号11、WWP1 WWドメイン2)、GPLPPGWEKRVDSTDRVYFVNHNKTTQWEDPR TQGLQ (配列番号12; WWP1 WWドメイン3)、およびEPLPEGWEIRYTRGVRYFVDHNTRTTTFKDP R NGKSS (配列番号13; WWP1 WWドメ

イン4)が含まれる。本明細書に記載されるアッセイの中で、WWドメインを含むポリペプチドは、全長のHECT E3ユビキチンリガーゼ、WWドメインを含むその一部、またはWWドメインが1以上の置換、付加、置換および/または欠失により、変異体のSmad PYモチーフに結合する能力が、天然のWWドメイン配列と比較して実質的に減少しない（すなわち、増大するか、変化しないか、または10%以上減少しない）ように修飾されている上記のポリペプチドの変異体であってよい。この結合活性は、本明細書に記載される代表的な結合アッセイを用いて評価することができる。

### 【0033】

Smad PYモチーフはPPXY (Pro-Pro-Xaa-Tyr; 配列番号14) 配列（ここで、XおよびXaaはどちらもいずれのアミノ酸でもよい）を含むSmadタンパク質の10~14の連続的なアミノ酸部分である。上記のPYモチーフはさらに、本明細書に記載されるHECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインに検出可能に結合する。代表的なSmad PYモチーフは、たとえばSmad1、2、3、5、6、および7の中に存在する。Smad PYモチーフは好ましくは、共通配列Ser/Thr-Pro-Pro-Pro-Pro/Ala/Gly-Tyr（配列番号15、ここで、Ser/Thrはセリンまたはスレオニンであるアミノ酸残基であり、Pro/Ala/Glyはプロリン、アラニンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸残基である）を満たす。Smad1および5（BMPに仲介されるシグナル伝達に参与する）においては、PYモチーフは配列TPPPAY（配列番号16）、好ましくはPADTPPPAY(L/M)PPPD（配列番号17）を含む。Smad2および3（TGF- $\beta$ に仲介されるシグナル伝達に参与する）においては、PYモチーフは配列TPPPGY（配列番号18）、好ましくはTPPPGY(I/L)SEDG（配列番号19）を含む。Smad PYモチーフを含むポリペプチドは、たとえば、ELESPPPPYSRYPM（配列番号20）、GPESPPPPYSRLSP（配列番号21）、PADTPPPAYLPPED（配列番号22）、PADTPPPAYMPPDD（配列番号23）、IPETPPPGYISEDG（配列番号24）またはAGLTTPPPGYLSEDG（配列番号25）などの配列が含まれる。本明細書に記載されるアッセイにおいて、PYモチーフを含むポリペプチドは、全長のSmadタンパク質、PYモチーフを含むその一部、または、PYモチーフが1以上の置換、付加、挿入、および/または欠失により、変異体のHECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインに結合する能力が実質的に減少しない（すな

わち、増大するか、変化しないか、または10%以上減少しない) ように修飾されている上記のポリペプチドの変異体であってよい。この結合活性は、本明細書に記載される代表的な結合アッセイを用いて評価することができる。

#### 【0034】

好ましくは、WWドメインまたはPYモチーフポリペプチドの変異体は保存的な置換を含む。「保存的な置換」は、アミノ酸が、ペプチド化学の分野における当業者がポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質が実質的に変化しないと予想するような、類似した特性を有する別のアミノ酸に置換されるものである。アミノ酸置換は、一般的に、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性の性質の類似性に基づいて行われる。たとえば、負に荷電したアミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシンおよびアルギニンが含まれ、類似した親水性値を有する荷電していない極性頭基を有するアミノ酸にはロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；およびセリン、スレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが含まれる。保存的な変化の例となる他のアミノ酸の群には、(1) Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr；(2) Cys、Ser、Tyr、Thr；(3) Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe；(4) Lys、Arg、His；および(5) Phe、Tyr、Trp、Hisが含まれる。変異体はこれに加えて、またはこれに代えて、非保存的な変化を含んでもよい。さらに変異体はこれに加えて（またはこれに代えて）、たとえば、ポリペプチドの二次構造およびヒドロパシーの性質に最小限の影響しか与えないアミノ酸の欠失または付加により修飾されてもよい。

#### 【0035】

WWドメインおよびPYモチーフポリペプチドは、内因性タンパク質と無関係な付加的な配列を含んでもよい。このような配列には、タンパク質のN-末端に位置し、翻訳に伴ってまたは翻訳後にタンパク質のトランスファーを指示する、シグナル（またはリーダー）配列が含まれる。ポリペプチドはまた、ポリペプチドの合成、精製または同定を容易にするため（たとえば、ポリHis）、またはポリペプチドの固体の支持体への結合を促進するためにリンカーまたは他の配列とコンジ

ュゲートしていてもよい。たとえば、ポリペプチドは免疫グロブリンFc領域にコンジュゲートしていてもよい。

#### 【0036】

WWドメインポリペプチドおよびPYモチーフポリペプチドを、候補薬剤が存在しないときに2つのポリペプチドの間の結合が可能になるような条件下で接触させる。候補薬剤を、WWドメインポリペプチドとPYモチーフポリペプチドの接触の前または後に反応混合物に加える。次いで、反応物をインキュベートし、標準的な技術を用いてWWドメインポリペプチドのPYモチーフポリペプチドへの結合をアッセイする。1つの好ましい結合アッセイは、上記のような、ポリペプチドの一方が結合している固体の支持体を用いる。結合していない薬剤を除去して、固体の支持体上の他方のポリペプチドの存在を検出することにより、結合をアッセイする。上記の検出は、たとえば、抗体または抗原結合断片検出試薬を用いて、または上記のような標識されたポリペプチドを用いた競合アッセイを用いて行うことができる。あるいは、支持体に固定化されていないポリペプチドそれ自体が結合したポリペプチドの検出を促進するタグを含んでいてもよい。タグには、ビオチン、酵素、放射性基（たとえば、 $^{32}\text{P}$ ）、染料、発光基、蛍光基および検出試薬が容易に結合する他の配列（たとえば、特定の抗体が特異的に結合する抗原配列）が含まれるが、これらに限定されない。一般的に、薬剤は、WWドメインポリペプチドとPYモチーフポリペプチドとの間の結合を検出可能にモジュレートしなければならない。

#### 【0037】

例として、一方のポリペプチド（すなわち、WWドメインポリペプチドまたはPYモチーフポリペプチド）は、非特異的相互作用により（たとえば、ポリスチレンプレートに）、またはタンパク質タグ相互作用（たとえば、His<sub>6</sub>融合タンパク質およびニッケルプレートとの間の相互作用）により固定化される。ポリペプチドは、たとえば、ポリスチレンアッセイプレート（Costar）を、200mM炭酸バッファ（Pierce, Rockford IL）中で、0.3~30 $\mu\text{g/mL}$ の範囲の濃度のポリペプチドと4℃で一晩接触させることにより固定化される。結合していないポリペプチドを、蒸留脱イオン化水で洗浄することにより除去した後、続いてプレートを1% BSA

/炭酸バッファーで、室温で2時間ブロッキングする。次に、プレートをTris/Tweenバッファー (50mM Tris pH7.5、100mM NaCl、1mM EDTA、1% BSA、1mM DTT 0.1% Tween20、プロテアーゼ阻害剤反応カクテル (Boehringer-Mannheim)) で洗浄する。他方のポリペプチドは標識され (たとえば、ビオチニル化)、固定化されたポリペプチドに結合させる (たとえば、Tris/Tweenバッファーに溶媒和し、4℃のアッセイプレート中で異なる時間インキュベートする)。次に、プレートをPBS/0.1%Triton X100で洗浄する。結合を、たとえば、アッセイウェルを、室温で1時間、DELFI Aアッセイバッファー/0.1% Triton X100中で1 $\mu$ g/mLのユウロピウム標識したストレプトアビジン (DELFI A; Wallac Oy, Turku, Finland) によりプローブして検出する。結合していないユウロピウム標識ストレプトアビジンをPBS/0.1% Triton X100で洗浄して除去する。ユウロピウムをDELFI A増強バッファーを用いて時間分解蛍光 (TRF) 測定のために放出する。TRF測定は、たとえば、DELFI A 1234 (Wallac Oy, Turku, Finland) フルオロメーターを用いて行う。

#### 【0038】

同様のアッセイにおいて、放射性標識をビオチンに置き換えてもよい。たとえば、 $^{32}$ P標識ポリペプチドを、WWドメインポリペプチドまたはPYモチーフポリペプチドに連結する適当な部位のリン酸化により製造することができる。このような部位の1つは、pGEX KGベクター (Pharmlngen) 中のPKA部位であって、 $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-ATPおよびプロテインキナーゼA (Sigma) を用いて標識できる。結合の量は、たとえば、Cerenkov計数または標準的な技術を用いたSDS-PAGEによって定量される。使用される固体の支持体もまた変えることができる。このようなアッセイのための1つの好ましい支持体は、neutravidinアガロースビーズ (Pierce, Rockford, IL) である。結合は、上記のような支持体を用いて、エンドオーバーシェーカーに入れたPBS/1% Tween20バッファー中で、4℃で様々な時間にわたってインキュベーションを行うことにより実施される。これらのアッセイはいずれも、結合がおこった後に固定化ができるように変更できることは明らかである。

#### 【0039】

候補薬剤の、WWドメインのPYモチーフへの結合に対する作用を決定するために、結合のレベルを候補薬剤の存在下および不在下で比較する。上記のような結合



を検出可能に阻害または促進する薬剤は、細胞においてTGF- $\beta$ ファミリーのメンバーに仲介されるシグナリングを変化させるために用いることができる。好ましい薬剤はTGF- $\beta$ および/またはBMPに仲介されるシグナリングをモジュレートする。

#### 【0040】

他のin vitroのアッセイは、E3ユビキチンリガーゼおよび/またはSmadのユビキチン化に対する薬剤の作用を評価するように設計される。in vitroのユビキチン化反応は当業者に公知である。たとえば、カップリングユビキチン化アッセイ（ここでは、ユビキチンのE1からE2へ、およびE2からE3へのトランスファーがモニターされる）を採用することができる。上記のアッセイではE1/E2/E3経路の再構成が必要となる。組換えE1およびE2成分は、対象のE3リガーゼへカップリングするユビキチンとして、さまざまな供給源（たとえば、BostonBiochem, Cambridge, MA）から入手することができる。放射性標識されたユビキチンは、 $[^3\text{P}]$ -リン酸塩の $\alpha$ - $[^3\text{P}]$ ATPからGST-ユビキチン融合タンパク質（pGEX KG発現ベクター）のPKA部位へのPKAに仲介される取り込みのような、標準的な技術を用いて製造することができる。1つの好ましいユビキチンアッセイバッファーは、50mM Tris pH7.6、1mM ATP、0.2mM EDTA、5mM  $\text{MgCl}_2$ 、1ユニットの無機ピロホスファターゼ、0.005% Triton X100および $1\mu\text{M}$ スタウロスポリン(staurosporine)である。0.030mLの反応液中に、一般的に次のような量の反応成分を含むのが好ましい：50~200ng E1、0.1~ $1\mu\text{g}$  E2、 $5\mu\text{g}$  GST-ユビキチン(BostonBiochem, Cambridge, MA)および50~200ng E3。反応は室温で行われ、メルカプタンを含まないSDS-PAGEローディングバッファーにより終結させる。反応はSDS-PAGEにより分析し得る。アッセイも同様に、例えば、HeLa細胞抽出画分由来の内因性タンパク質を加えて行う。Smadタンパク質のユビキチン化を測定するために、反応液中にSmadポリペプチドを加える（Hershkoら、J. Biol. Chem. 258:8206-8214, 1983を参照されたい）。これらのアッセイをさらに、アッセイに100~1000ngの20Sプロテアソーム（Boston Biochem, Cambridge, MA）を取り込むことにより、Smadタンパク質の分解を測定するように変更することができる。

#### 【0041】

上記のようなアッセイに用いるためのSmadポリペプチドは、共有結合により結合したユビキチンの検出を容易にするためにタグをつけることができる。上記のポリペプチドは、ポリペプチドが機能的PYモチーフおよびユビキチン化部位を含むならば、全長のSmadタンパク質であってよく、または末端切断タンパク質またはその変異体であってよい。ユビキチン化部位は当業者に公知の基準に基づいて同定される。たとえば、ユビキチン化は一般的に、HECT/WW結合部位の100アミノ酸内のリシン残基上でおこる。同様に、上記のアッセイに用いるHECT E3ユビキチンリガーゼは、リガーゼが機能的WWドメインおよびHECTドメインを含み、目的のSmadタンパク質をユビキチン化するならば、全長のタンパク質、末端切断タンパク質またはその誘導体であってよい。

#### 【0042】

細胞に基づくアッセイ（すなわち、完全な細胞を候補薬剤に暴露するアッセイ）を用いて細胞環境中でのSmadタンパク質に対する特定の薬剤の作用を検出することができる。そのようなアッセイは、TGF- $\beta$ ファミリーメンバーリガンドに対する受容体を発現する細胞のいずれかを用いて行うことができる。好ましい実施態様においては、細胞はTGF- $\beta$ 及び／又は骨形成タンパク質（BMP）受容体を発現する。既知のBMP受容体としては、ALK2、3及び6が挙げられる（Attisanoら、Cell 68:97-108, 1992；ten Dijkeら、Oncogene 8:2879-2887, 1993を参照されたい）。既知のTGF- $\beta$ 及びアクチビン受容体は、例えば、Attisanoら、Cell 75:671-680, 1993；Attisanoら、Mol. Cell. Biol. 16:1066-1073, 1996；Ebnerら、Science 262:900-902, 1993；Linら、Cell 68:775-785, 1992；Mathews及びVale、Cell 65:973-982, 1991；及びTsuchidaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11242-11246, 1993に記載されている。好ましい細胞は、（既知のBMP又はTGF- $\beta$ 受容体に対して作製された抗体を用いる）免疫化学的方法を用い、細胞に結合しているBMP若しくはTGF- $\beta$ の直接測定によるか、又はBMP若しくはTGF- $\beta$ への暴露後の細胞中のBMP又はTGF- $\beta$ 仲介応答の検出によって容易に同定できる。そのような方法は当業界で周知である。好ましい細胞の同定に好適な方法は、その発現がTGF- $\beta$ 又はBMP応答エレメントの制御下にある受容体遺伝子の使用を含む。一般に、細胞はそのようなアッセイのいずれかを用いて検出可能なレベルの受

容体を発現するはずである。BMP受容体を発現する細胞としては、以下に限定されないが、骨細胞、ニューロン及び腎細胞が挙げられる。TGF- $\beta$  受容体は一般に広く発現されている。

#### 【0043】

TGF- $\beta$  ファミリーメンバー受容体を発現する細胞は、特定の細胞タイプに適切なTGF- $\beta$  ファミリーメンバーによって仲介される遺伝子発現のためのアッセイのいずれかによって、細胞中で検出可能なレベルのTGF- $\beta$  ファミリーメンバー仲介シグナリングをもたらすのに十分な量のTGF- $\beta$  ファミリーメンバーと接触させる。そのようなアッセイはTGF- $\beta$  ファミリーメンバー調節遺伝子の発現の増大の検出（例えば、ハイブリダイゼーション又は増幅系アッセイ）、又はTGF- $\beta$  若しくはBMP調節プロモーターに機能し得る形で連結されたレポーター遺伝子発現のアッセイに基づくものであってもよい。あるいは、そのようなアッセイは機能性アッセイであってもよい。例えば、1～2週間のBMP処理は、骨芽細胞の分化を刺激する。そのような細胞のBMPとの接触は、鉱化（mineralization）によって検出されるような、分化をもたらすのに十分でなければならない。一般に、ある細胞と100 ngのBMPを2～24時間接触させることは、細胞中で検出可能なレベルのBMP仲介シグナリングをもたらすのに十分である。

#### 【0044】

候補薬剤のTGF- $\beta$  ファミリーメンバー仲介シグナリングへの作用を測定するために、細胞を上記のようなTGF- $\beta$  ファミリーメンバーリガンド、及び候補薬剤と接触させる。細胞は、同時に又は逐次的に連続して両薬剤と接触させる。用いる薬剤の量は、薬剤の種類及び用いる特異的アッセイによって変動するであろうが、一般に、候補薬剤の1～50  $\mu$ Mで十分である。好ましい実施態様では、TGF- $\beta$  ファミリーメンバーはTGF- $\beta$  又はBMPである。

#### 【0045】

TGF- $\beta$  ファミリーメンバー及び候補薬剤との接触後、TGF- $\beta$  ファミリーメンバー誘導性Smad タンパク質分解（好ましくはSmad 1、2、3、5、6又は7の分解）をアッセイする。以下に限定されないが、（1）Smad タンパク質；（2）Smad タンパク質のユビキチン化；又は（3）細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性

のレベルを検出するアッセイを含む多様なアッセイのいずれかを用いて、Smad タンパク質分解を評価できることは明らかであろう。以下に詳細に記載される各タイプのアッセイでは、検出されるレベルは、同じ条件下であるが、候補薬剤の不存在下での、同じ種類の細胞中で検出されるレベルと比較される。候補薬剤の不存在下で検出されるシグナルに対する、候補薬剤の存在下で検出されるシグナルにおける統計的に有意な差は、その薬剤が、細胞中でのTGF- $\beta$ ファミリーメンバー仲介シグナル伝達をモジュレートすることを示す。

#### 【0046】

Smad タンパク質のレベルを評価するには、周知の免疫化学的方法を用いることができる。そのような方法は、通常、Smad タンパク質に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性断片などの薬剤を用いる。そのようなアッセイを行うためには、一般に細胞を溶解し、前処理した溶解物又は前処理していない溶解物を抗原特異的に結合させる条件下で抗体と接触させる。次いで、結合した抗体を適当な検出試薬によって検出する。

#### 【0047】

細胞溶解物中のSmad タンパク質のレベルを検出するために用いることができる多様なアッセイ様式がある。例えば、Harlow及びLanc、抗体：実験室マニュアル (Antibodies: A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい。ある実施態様では、アッセイは、Smad タンパク質に結合して溶解物の残渣からSmad タンパク質を除去するための固体支持体上に固定された結合剤の使用を含む。次いで、結合されたSmad タンパク質を、リポーター基を含有し、結合剤／Smad 複合体に特異的に結合する検出試薬を用いて検出することができる。そのような検出試薬は、例えば、Smad タンパク質に特異的に結合する抗体を含むことができる。あるいは、Smad タンパク質又はその部分をリポーター基で標識し、結合剤と溶解物をインキュベートした後に固定化された結合剤に結合させる、競合アッセイを用いることができる。溶解物の構成成分が、標識されたSmad ポリペプチドの結合剤への結合を阻害する程度は、溶解物中のSmad タンパク質の指標となる。

#### 【0048】

そのようなアッセイに用いるための固体支持体は、結合剤が結合されうる当業者に公知の任意の材料であってよい。例えば、固体支持体は、マイクロタイタープレートの試験ウェル又はニトロセルロース若しくは他の適当な膜であってよい。あるいは、支持体は、ガラス、ファイバーガラス、ラテックス又はプラスチック材料などのビーズ又はディスクであってよい。特許及び学術文献に十分に記載されている当業者に公知の多様な方法を用いて固体支持体上に結合剤を固定化することができる。本発明においては、語句「固定化 (immobilization)」とは、非共有的会合（例えば、吸着）、及び共有結合（結合剤と支持体上の官能基との間の直接結合であってよいし、又は架橋剤による結合であってよい）の両者をいう。マイクロタイタープレートのウェル又は膜への吸着による固定化が好ましい。そのような場合、吸着は適当なバッファー中の結合剤を適当な時間（通常は約1時間～約1日の間）、固体支持体と接触させることによって達成できる。一般に、プラスチックのマイクロタイタープレート（例えば、ポリスチレン又はポリビニルクロリド）のウェルと約10 ng～約10  $\mu$ g、好ましくは約100 ng～約1  $\mu$ gの範囲の量の結合剤との接触は、適当量の結合剤を固定化するのに十分である。

#### 【0049】

特定の実施態様では、アッセイは2抗体サンドイッチアッセイである。このアッセイは、固体支持体（一般にマイクロタイタープレートとウェルである）上に固定化された抗体と溶解物を最初に接触させ、サンプル中のSmadタンパク質を固定化抗体に結合させる（例えば、室温で30分間のインキュベーション）ことによって実行できる。次いで、結合されていないサンプルを固定化されたSmad-抗体複合体から除去し、リポーター基を含有する検出試薬（好ましくはSmadタンパク質の別の部位に結合できる第2抗体）を加える。次に、固体支持体に結合して残る検出試薬の量を、特定のリポーター基に適切な方法を用いて測定する。放射活性基に対しては、シンチレーション計数、又はオートラジオグラフィー法が一般に適切である。分光学的方法を用いて、染料、発光基及び蛍光基を検出することができる。ビオチンは、別のリポーター基（一般的には、放射活性基若しくは蛍光基又は酵素）に結合された、アビジンを用いて検出できる。酵素リポ

ーター基は、一般に基質を添加し（一般に、特定の期間にわたって）、次いで反応生成物を分光学的に又は他の分析方法で分析することによって検出することができる。

#### 【0050】

Smad タンパク質のユビキチン化レベルは、ユビキチン化タンパク質の電気泳動度の変化に基づいて容易に測定できる。簡単に言えば、細胞を分解し、分解物中に存在するタンパク質をSDS-PAGEによって分離することができる。目的のタンパク質は、ウエスタンブロット分析によって検出できる。ユビキチン化は、タンパク質の見かけの分子量を、ゲルのより高分子量領域へシフトさせる。定量結果又は半定量結果は、標識された第2抗体、又は当業界で公知の他の検出試薬を用いて得られる。

#### 【0051】

細胞中のHECT E3ユビキチンリガーゼ活性は、当業界で一般的に用いられる多様なユビキチン化アッセイのいずれかによって評価できる。そのようなアッセイは、通常、タグ付き標的タンパク質及び／又は標識ユビキチンを用いる。次いで、例えば、本明細書中に記載のカップリングユビキチン化アッセイを用いてリガーゼ活性を評価する。そのようなアッセイは、一般にE3ユビキチンリガーゼ（一般に、溶解物中のもの、又は細胞溶解物から部分的に若しくは実質的に精製されたもの）を用いてタグ付き標的タンパク質をユビキチン化する。放射標識ユビキチンを用いて、例えば、標的タンパク質のユビキチン化量を、未結合ユビキチンを除去した後にシンチレーションカウントすることによって測定することができる。あるいは、標的タンパク質の分解は、反応物のSDS-PAGE分割（resolution）及びタグの検出によって直接的に評価できる。タンパク質のユビキチン化及び分解を検出するアッセイは当業界で周知であり、代表的なアッセイを本明細書中に記載する。

#### 【0052】

一般に、ある薬剤のTGF- $\beta$ ファミリーメンバー仲介シグナリングへの影響は、上記アッセイでのその活性に基づいて測定できる。BMP仲介シグナリングを増大させるSmad（Smad 1及び5を含む）に対しては、Smad タンパク質分解を阻害す

る薬剤を用いてBMP仲介シグナリングを増大させることができる。同様に、そのようなSmadタンパク質の分解を増大させる薬剤を用いてBMP仲介シグナリングを阻害することができる。TGF- $\beta$  仲介シグナリングに対しては、Smad 2及び/又はSmad 3タンパク質分解を阻害する薬剤を用いてシグナリングを増大させることができ、そのようなSmadタンパク質の分解を増大させる薬剤を用いてシグナリングを阻害することができる。本明細書中で提供されるスクリーニング方法を用いて同定された薬剤は、下記にさらに詳細に説明するように、多様な治療の局面において用いることができる。

#### 【0053】

#### TGF- $\beta$ ファミリーメンバー仲介シグナリングをモジュレートする薬剤の使用法

BMP仲介シグナリングをモジュレートする薬剤は、特定の細胞タイプでの不十分な若しくは過剰なBMP仲介シグナリングと関係する症状の予防又は治療に用いることができる。一般に、BMP仲介シグナリングを増大させる（例えば、HECT E3ユビキチンリガーゼのWWドメインのSmad 1又はSmad 5 PYモチーフへの結合を阻害する）薬剤は、骨同化の刺激だけでなく、折れた骨、骨粗鬆症及び急性若しくは慢性腎機能不全の治療に有用である。BMP仲介シグナリングを阻害する薬剤は、例えば、癌、炎症、老化及び感染症の治療に用いることができる。

#### 【0054】

同様に、TGF- $\beta$  仲介シグナリングをモジュレートする薬剤は、特定の細胞タイプでの不十分な若しくは過剰なTGF- $\beta$  仲介シグナリングと関係する症状の予防又は治療に用いることができる。一般に、TGF- $\beta$  仲介シグナリングを阻害する（例えば、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインのSmad 2又はSmad 3 PYモチーフへの結合を増大させる）薬剤は、癌、炎症、神経変性及び線維症の治療に有用である。

#### 【0055】

患者に投与するためには、一般に、1以上の薬剤が医薬組成物として製剤化され、そしてそれは、滅菌した水性若しくは非水性の溶液、懸濁液又は乳液であってよく、そして生理学的に許容可能な担体（すなわち、有効成分の活性を阻害しない非毒性物質）をさらに含む。当業者に公知の好ましい担体を、医薬組成物で

用いることができる。代表的な担体としては、生理的食塩水、ゼラチン、水、アルコール、天然若しくは合成油、糖類溶液、グリコール、注射可能な有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）又はそのような物質の組み合わせが挙げられる。また、そのような組成物は、バッファー（例えば、中性の緩衝生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、サッカロース又はデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド又はアミノ酸（例えば、グリシン）、抗酸化剤、抗菌性化合物、キレート剤（例えば、EDTA又はグルタチオン）、アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、不活性ガス及び／又は防腐剤を含んでいてもよい。また、本発明の組成物は、凍結乾燥物として製剤化されてもよい。また、医薬組成物は、生物学的に活性な又は不活性な、他の化合物を含んでいてもよい。

#### 【0056】

本明細書中に記載の組成物は、徐放性製剤（すなわち、投与後に化合物の緩やかな放出を達成するカプセルなどの製剤）の一部として投与してもよい。そのような製剤は、通常、既知の方法を用いて製造でき、例えば、経口、直腸内若しくは皮下埋め込みによるか、又は所望の標的部位での埋め込みによって投与できる。徐放性製剤は、担体マトリックス中に分散された及び／又は速度制御膜によって囲まれたレザバー内に含有されたポリペプチド、ポリヌクレオチド又はモジュレート剤を含有していてもよい。そのような製剤中で用いるための担体は、生体適合性であり、また、生分解性であってもよく；製剤は比較的一定したレベルでの放出を提供するものが好ましい。徐放性製剤中に含有される活性化合物の量は、埋め込み部位、放出速度及び予想放出持続時間並びに治療又は予防されるべき症状の性質に依存する。

#### 【0057】

そのような薬剤の別の送達システムは、コロイド分散系である。コロイド分散系としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、並びに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームを含む脂質に基づく系が挙げられる。*in vitro*及び*in vivo*での送達媒体として用いるのに好ましいコロイド系は、リポソーム（すなわち、人工膜小胞）である。0.2～4.0  $\mu$



mの範囲のサイズの大きなユニラメラ小胞 (LUV) が、相当な割合で大きな巨大分子を含有する水性バッファーを封入できることは示されている。リポソームのターゲティングは、解剖学的因子及び力学的因子に基づいて分類できる。解剖学的分類は、選択性のレベル（例えば、臓器特異的、細胞特異的、及び細胞小器官特異的）に基づいている。力学的ターゲティングは、受動的か能動的かに基づいて区別できる。受動的ターゲティングは、洞様毛細血管を含む臓器中の細網内皮系 (RES) の細胞にリポソームが自然に分布する傾向を利用する。一方、能動的ターゲティングは、リポソームを特異的リガンド（例えば、モノクローナル抗体、糖、糖脂質、又はタンパク質）に結合させることによるか、又はリポソームの組成又はサイズを変化させることによってリポソームを変性させて、自然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞タイプへのターゲティングを達成する。

#### 【0058】

細胞又は組織特異性を達成するために、（幾つかの例では）薬剤を局所的に投与してもよい。他の薬剤は、特定のHECT E3/Smad タンパク質相互作用に特異的であってもよく、従って、特異的な標的細胞タイプ又は組織を有しうる。しかしながら、ある例では、薬剤の所望の部位への送達を促進するターゲティング部分を用いることが有利である。ターゲティング部分は、標的細胞又は組織への薬剤の送達を促進し、それによって薬剤の局所的濃度を増加させる任意の化合物（例えば、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体、タンパク質又はリポソーム）又は細胞である。ターゲティング部分としては、抗体若しくはその断片、レセプター、リガンド及び標的組織の細胞若しくはその近傍に結合する他の分子が挙げられる。抗体ターゲティング剤は、無傷の（完全な）分子、その断片、又はその機能上の同等物でありうる。抗体断片の例は、従来の方法によって又は遺伝子工学若しくはタンパク質工学によって製造できる、F(ab')<sub>2</sub>、-Fab'、Fab及びFv断片である。結合は通常共有的であり、例えば、直接縮合若しくは他の反応によるか、又は2官能性若しくは多官能性リンカーによって達成されうる。ターゲティング部分は、薬剤が治療的利益を及ぼすことが期待される細胞（類）又は組織（類）に基づいて選択できる。

#### 【0059】

上述のように、TGF- $\beta$  及び／又はBMP仲介シグナリングをモジュレートする薬剤による治療から恩恵をうけることができる患者は、特定の細胞タイプ中での不十分な若しくは過剰なTGF- $\beta$  及び／又はBMP仲介シグナリングと関係する症状に悩まされている（又はその症状が進行する危険にある）患者である。そのような症状は、その症状に対する当業界で受け入れられている診断基準を用いて、又はSmad タンパク質レベルの*in vitro*分析によって診断できる。

#### 【0060】

薬剤は、治療されるべき症状に適切な任意の手法、例えば、局所、経口、鼻、鞘内、直腸、膣、舌下又は非経口投与（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、海綿体内、管内（intrameatal）又は尿道内注射若しくは注入）によって患者に投与できる。適切な投与量並びに好適な投与間隔及び頻度は、患者の症状、患者の疾病のタイプ及び重篤度、有効成分の特定の形態並びに投与方法などの因子によって決定される。一般に、適切な投与量及び治療計画は、治療的及び／又は予防的利益（例えば、より頻度の高い完全若しくは部分的な緩解、又はより長く疾病のない及び／又は全体的な生存などの改善された臨床成果）を提供するのに十分な量の薬剤（類）を提供するものである。予防的使用のためには、用量は、TGF- $\beta$  及び／又はBMP仲介シグナリングと関係する症状の予防、発症の遅延又はその症状の重篤度の低減に十分なものでなければならない。最適な投与量は、通常、実験的モデル及び／又は臨床試験を用いて決定できる。有効な治療を提供するのに十分な最少投与量の使用が通常好ましい。患者は、通常、治療又は予防される症状に適当なアッセイ（そしてそれは、当業者が精通している）を用いて治療又は予防の有効性をモニターされうる。好適な用量サイズは、患者のサイズによって変動するが、通常は、10～60 kgの動物に対して約10 mL～約500 mLの範囲である。

#### 【0061】

下記実施例は、限定ではなく、例示のために提供されるものである。

#### 【0062】

##### 実施例

##### 実施例 1

### Smad タンパク質のユビキチン化及びE3/Smad タンパク質結合の初期特性評価

この実施例は、Smad タンパク質のBMP誘導性ユビキチン化、及びSmad タンパク質に結合するHECT E3リガーゼドメインの同定を説明する。

#### 【0063】

HAタグ付きSmad 1発現ベクターをCOS細胞中にトランスフェクションした。次いで、トランスフェクションされた細胞を、50～100  $\mu$ Mのプロテアソーム阻害剤Leu-Leu-Phe (LLF) の不存在下又は存在下に100 ngのBMPで4時間処理した。細胞を溶解し、同量のタンパク質を各レーンに載せた。抗HA抗体 (BAbCo、Berkeley、CA) を用いてウエスタン分析を行った。図2に示すように、BMPはSmad 1分解を誘導し、LLFはBMP誘導性Smad 1分解をブロックする。

#### 【0064】

Smad 1のin vivoでのユビキチン化を評価するために、Smad 1発現ベクターをCOS細胞中にトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞を、上記のように、BMP及びプロテアソーム阻害剤LLFで処理した。次いで、細胞を溶解し、同量のタンパク質を、抗HA抗体を用いる免疫沈降に用いてタグ付きSmad 1タンパク質を沈殿させた。免疫沈降されたSmad 1をSDS-PAGEにかけ、次いで抗HA抗体又は抗ユビキチン抗体 (BAbCo) を用いるウエスタンブロットを行った。LLFで処理した細胞とLLF+BMPで処理した細胞は、明らかに、より高分子量のユビキチン化されたSmad 1タンパク質を蓄積した (図3)。

#### 【0065】

Smad と種々のWWドメインとのin vitroでの結合を分析するために、HAタグ付きSmad 1をCOS細胞中で発現させた。発現されたSmad 1を、細胞溶解物から免疫沈降させた。徹底的な洗浄の後、免疫沈降されたSmad 1を、WWP1 WWドメインを有する<sup>32</sup>P標識されたGST融合タンパク質とを混合した。結合生成物を洗浄し、SDS-PAGEにかけた。COS抽出物及び<sup>32</sup>P標識GSTタンパク質を対照として用いた。WWP1.1 (第1のWWリピート: LPSGWEQRKDPHGRTYYVDHNTRTTTWERPQPLPPGWE (配列番号26) とのGST融合物) は、PYモチーフで突然変異Smad 1 (図4、レーン3) ではなくSmad 1 (図4、レーン2) に結合することが見出された。用いたSmad 1 PYペプチド配列は: ピオチン-Ahx-PADTPPPAYLPPED-CONH<sub>2</sub> (配列番号22)

であり、突然変異Smad 1 PYペプチド配列は：ビオチン—Ahx—PADTPPPAHLPPED—C  
ONH<sub>2</sub>（配列番号27）であった。

### 【0066】

これらの結果は、BMPが、HECT E3ユビキチンリガーゼを含む経路を用いてSmad  
タンパク質のユビキチン化を誘導することを示している。

### 【0067】

#### 実施例2

HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインとSmad タンパク質PYモチーフペプチドの  
間の相互作用

この実施例は、HECT E3 WWドメインのPYモチーフへの結合を説明する。

### 【0068】

HECTドメインE3リガーゼWWP1は、WBP-1 PYモチーフペプチドと相互作用する4  
つのWWドメイン（WWP1.1、1.2、1.3、1.4）を有する（Chen及びSudo<sup>1</sup>、Proc. N  
at<sup>l</sup>. Acad. Sci. USA 92:7819-7823, 1995）。各ドメインの配列は次のとおりで  
ある：

WWP1.1: LPSGWGWEQRKDPHGRTYYVDHNTRTTTWERPQPLPPG  
(配列番号 10);  
WWP1.2: QPLPPGWERRVDDRRRVYYVDHNTRTTTWQRPTMESVR  
(配列番号 11);  
WWP1.3: GPLPPGWEKRVDSTDRVYFVNHNTKTTQWEDPRTQGLQ  
(配列番号 12); and  
WWP1.4: EPLPEGWEIRYTREGVRYFVDHNTRTTTFKDPKNGKSS (配列  
番号 13)

各ドメインはGST融合タンパク質として個々に発現された。TRF結合アッセイを  
用いてPYモチーフペプチドとこれらのドメイン類又はGSTのみとの相互作用を評  
価した。WWドメインを、各濃度（0、1、3、10  $\mu$ g/mL）で、200 mM炭  
酸塩バッファー（Pierce、Rockford、IL）中4℃で一晩、96ウエルのポリスチ  
レン製アッセイプレート（Costar社製）に結合させた。結合していないWWドメイ  
ンを蒸留脱イオン水で洗浄して除き、プレートを1% BSA/炭酸塩バッファーに

より室温で2時間ブロックした。次いで、プレートにTris/Tweenバッファー（50 mM トリス、pH 7.5、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1% BSA、1 mM DTT、0.1% Tween 20、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Boehringer-Mannheim））で洗浄した。

#### 【0069】

PYモチーフペプチドをC<sub>6</sub>リンカー及びビオチンタグで合成した。下記のPYモチーフを用いた：

WBP1：ビオチン-Ahx-HPGTPPPPYTVGPG-CONH<sub>2</sub>（配列番号28）；

Nedd：ビオチン-Ahx-IPGTPPPNYDSLRL-CONH<sub>2</sub>（配列番号29）；

突然変異Nedd：ビオチン-Ahx-IPGTPPPNHDSSLRL-CONH<sub>2</sub>（配列番号30）。

#### 【0070】

これらのビオチン化ペプチドをTris/Tweenバッファー中で溶媒和させ、アッセイプレートに加えた（30 μM）。プレートを4℃で様々な捕捉時間インキュベートした。次いで、プレートをPBS/0.1% Triton X100で洗浄し、室温で1時間、DELTAアッセイバッファー/0.1% Triton X100中で、1 μg/mL ユロピウム標識されたストレプトアビジン（DELTA; Wallac Oy, Turku, Finland）でプロービングした。結合していないユロピウム標識されたストレプトアビジンをPBS/0.1% Triton X100で洗浄した。ユロピウムをDELTAエンハンスメントバッファーによる時分解蛍光測定（time-resolved fluorescence measurements）のために遊離させた。測定は、DELTA 1234又はVictor製蛍光光度計のいずれかによって行った。

#### 【0071】

WBP1ペプチドは、GSTではなく、WWP1 WWドメインに特異的に結合した（図5A～5D）。他のビオチン化ペプチドは、WWドメイン又はGSTとは特異的に相互作用しなかった（図5A～5D）。

#### 【0072】

次に、Smad 1、2、3、5、6及び7（表1）由来のSmad PYモチーフペプチドを、WWP1由来のWWドメインによって評価した（図6A～6D及び7A～7B）。GST-WWドメイン融合タンパク質及び単独のGSTを、30 μg/mLで一晩被覆した。BSA

によってウエルをブロックした後、WWドメインペプチドをSmad PYモチーフペプチドで滴定した。Smad 7ペプチドは、WWP1の第2のWWドメインと非常に強い相互作用を示し(WWP1.2; 図6A~6D); 報告されているWBP1 PYペプチドよりも非常に強い相互作用を示した(図5A~5D)。Smad 5及びSmad 6ペプチドは、WWP1 WWドメインとの測定可能な相互作用を有するが、Smad 7の相互作用に比べて緩やかであった(図6A~6D及び7A~7B)。Smad 1、2又は3由来のPYモチーフペプチドには測定可能な相互作用は無かった。

【0073】

【表1】

表 1

Smad タンパク質 PY モチーフ

Smad タンパク質	PY モチーフペプチド
Smad 7	ELESPPPPYSRYPM (配列番号 20)
Smad 6	GPESPPPPYSRLSP (配列番号 21)
Smad 1	PADTPPPAYLPPED (配列番号 22)
Smad 5	PADTPPPAYMPPDD (配列番号 23)
Smad 2	IPETPPPGYISEDG (配列番号 24)
Smad 3	AGLTTPPPGYLSEDG (配列番号 25)

Smad 7とWWP1 WWドメイン及びRSP5由来の第2のWWドメインとの相互作用の詳細な評価に着手した。GSTを用いて非特異的なバックグラウンド相互作用を補正した。WWドメインのペプチド滴定を、データの非線形最少二乗法適合及びスキッチャード分析によって評価した(図8A~8B)。両方の方法が、WWP1.2がSmad 7ペプチドとの非常に特異的な相互作用を有することを示した( $K_d = 2.4 \mu\text{M}$ )。WWP1.1及びWWP1.3由来の結合相互作用は、スキッチャード分析において線形プロットを与えなかった。

【0074】

これらの結果は、HECT E3ユビキチンリガーゼWWドメインがSmad タンパク質PY

モチーフに結合することを示している。

【0075】

### 実施例3

#### HECT E3リガーゼユビキチン化を検出するための結合ユビキチンアッセイ

この実施例は、E1/E2/E3経路における標識されたユビキチン分子の運命を評価する結合酵素的アッセイを説明する。

【0076】

組み換えE1 (ubc5c) 及びE2 (ubc7) 成分を、BostoneBiochem社 (Cambridge, MA) から入手した。 $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-ATP由来の[ $^{32}$ P]-ホスフェートのGST-Ub融合タンパク質 (pGEX KG発現ベクター) のPKA部位へのPKA仲介組み込みによって、放射標識されたユビキチンを生産した。ユビキチンアッセイバッファー (Ub B) は次のとおりである: 50 mM Tris、pH7.6、1 mM ATP、0.2 mM EDTA、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1単位の無機ピロホスファターゼ、0.005% Triton X100、及び1  $\mu$ Mスタウロsporin。0.030 mLの反応物中に次の成分が存在する: 50~200 ngのE1、0.1~1  $\mu$ gのE2及び5  $\mu$ gのGST-Ub。室温で反応を行い、メルカプタンを含有しないSDS-PAGEローディングバッファーで停止させた。SDS-PAGEによって反応物を分析した。E1及びE2 (ubc 5c及びubc7) の活性部位のシステイン残基のユビキチン化が観察された (図9A~9C)。20 mM DTTの添加が、チオエステル中間体の形成を阻害した (図9B~9C)。

【0077】

HECT E3リガーゼへの転移を評価するため、示されるように、WWP1の611-985又は611-990の残基を含有するWWP1 HECTドメイン50~100 ngを添加して、上記のようにアッセイを行った。これらのドメインの配列を下記に示す:

WWP1 HECTドメイン611-985:

GFRWKL AHFRYLCQSNALPSHV KINVS RQTLFEDSFQQIMALKPYDLRR  
 RLYVIFRGEGLDYGGLAREWFFLLSHEVLNPMYCLFEYAGKNNYCLQI  
 NPASTINPDHLSYFCFIGRFIAMALFHGKFIDTGFSLPFYKRMLSKKLTIKD  
 LESIDTEFYNSLIWIRDNNIEECGLEMYFSVDMEILGKVTSHDLKLGGSN  
 LVTEENKDEYIGLMTEWRFSRGVQEQTAKFLDGFNEVVPLQWLQYFDE  
 KELEVMLCGMQEVDLADWQRNTVYRHYTRNSKQIIWFWQFVKETDNE  
 VRMRLQFVTGTCRLPLGGFAELMGSGPRNSQKFCIEKVGKDTWLP  
 HTC FNRLDLPPYKSYEQLKEKLLFAIEETE (配列番号 31)

WWP1 HECTドメイン 611-990:

GFRWKL AHFRYLCQSNALPSHV KINVS RQTLFEDSFQQIMALKPYDLRR  
 RLYVIFRGEGLDYGGLAREWFFLLSHEVLNPMYCLFEYAGKNNYCLQI  
 NPASTINPDHLSYFCFIGRFIAMALFHGKFIDTGFSLPFYKRMLSKKLTIKD  
 LESIDTEFYNSLIWIRDNNIEECGLEMYFSVDMEILGKVTSHDLKLGGSN  
 LVTEENKDEYIGLMTEWRFSRGVQEQTAKFLDGFNEVVPLQWLQYFDE  
 KELEVMLCGMQEVDLADWQRNTVYRHYTRNSKQIIWFWQFVKETDNE  
 VRMRLQFVTGTCRLPLGGFAELMGSGPRNSQKFCIEKVGKDTWLP  
 HTC FNRLDLPPYKSYEQLKEKLLFAIEETEGFGQE (配列番号 32).

WWP1のHECTドメインが、E1/ubc5C又はE1/ubc7のいずれかによってチャージされていることが示された(図10A~10C及び11A~11C)。短いHECTドメインであるWWP1(611-985)のみが、1つのユビキチン分子によって、恐らくその活性部位のシステインにチャージされた。WWP1(611-985)を有するユビキチン付加生成物のDTTへの感受性は、活性部位のシステインへの結合と一致する(図11A及び11B、比較レーン4~レーン2)。長いHECTドメインであるWWP1(611-990)は、基質選択性の欠如を示した(図10A及び10B)。ubc5C又はubc7のいずれかによって仲介されるWWP1(611-990)反応のタイムコースは、E2 ubc5Cが、WWP1(611-990)の活性化により効果的であることを示した(図12A~12C)。GST-ユビキチンの喪失は、高分子量種(>201 kDa)の出現と相関していた。

#### 【0078】

これらの結果は、Smad タンパク質分解におけるHECT E3ユビキチンリガーゼの役割を裏付けている。

#### 【0079】

上述したことから、説明のために、本発明の特定の実施態様を本明細書中に記



載したが、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく種々の改変がなされうることは理解できるであろう。従って、本発明は添付した特許請求の範囲による以外には限定されることはない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Signal Pharmaceuticals, Inc.  
Heokstra, Merl F.  
Xie, Weilin  
Murray, Brion  
Mercurio, Frank

<120> METHODS FOR MODULATING SIGNAL  
TRANSDUCTION MEDIATED BY TGF-BETA AND RELATED PROTEINS

<130> 860098.433PC

<140> PCT  
<141> 2000-08-29

<160> 32

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)...(1)  
<223> Xaa = Tyrosine or Phenylalanine

<221> VARIANT  
<222> (2)...(4)  
<223> Xaa = any amino acid; 0-1 residues may be missing

<221> VARIANT  
<222> (6)...(16)  
<223> Xaa = any amino acid; 0-3 residues may be missing

<221> VARIANT  
<222> (20)...(20)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (22)...(22)  
<223> Xaa = Valine, Isoleucine or Leucine

<221> VARIANT  
<222> (23)...(27)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (29)...(29)

<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (30)...(30)  
<223> Xaa = Lysine or Arginine

<221> VARIANT  
<222> (31)...(33)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (34)...(34)  
<223> Xaa = Leucine or Valine

<221> VARIANT  
<222> (37)...(37)  
<223> Xaa = Valine or Leucine

<221> VARIANT  
<222> (40)...(40)  
<223> Xaa = Threonine or Serine

<221> VARIANT  
<222> (41)...(41)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (45)...(45)  
<223> Xaa = Leucine, Valine, Methionine, Alanine or Isoleucine

<221> VARIANT  
<222> (46)...(46)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (49)...(50)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (52)...(61)  
<223> Xaa = any amino acid; 0-6 residues may be missing

<221> VARIANT  
<222> (63)...(71)  
<223> Xaa = any amino acid; 0-2 residues may be missing

<221> VARIANT  
<222> (74)...(75)  
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT  
<222> (81)...(81)  
<223> Xaa = any amino acid

```

<221> VARIANT
<222> (86)...(86)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (88)...(88)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (90)...(92)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (93)...(93)
<223> Xaa = Leucine or Methionine

<221> VARIANT
<222> (94)...(95)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (96)...(96)
<223> Xaa = Arginine or Lysine

<221> VARIANT
<222> (98)...(99)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (102)...(107)
<223> Xaa = any amino acid; 0-2 residues may be missing

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1          5          10          15
Trp Phe Trp Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa
20          25          30
Xaa Xaa Gln Phe Xaa Thr Gly Xaa Xaa Arg Leu Pro Xaa Xaa Gly Phe
35          40          45
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa
50          55          60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Pro Xaa Xaa His Thr Cys Phe Asn
65          70          75          80
Xaa Leu Asp Leu Pro Xaa Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85          90          95
Leu Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
100          105

<210> 2
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapien

<220>
<221> VARIANT

```

```

<222> (5)...(5)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (9)...(11)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (12)...(14)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

<221> VARIANT
<222> (16)...(16)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

<221> VARIANT
<222> (17)...(17)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (20)...(20)
<223> Xaa = hydrophobic residue (e.g., I,V,L or M)

<221> VARIANT
<222> (21)...(21)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (25)...(25)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

<221> VARIANT
<222> (28)...(28)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

<221> VARIANT
<222> (30)...(30)
<223> Xaa = any amino acid

<221> VARIANT
<222> (31)...(31)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

<221> VARIANT
<222> (33)...(33)
<223> Xaa = independently selected polar amino acid
      (e.g., S,H,P,D,E,T or Y)

```

<400> 2

Gly Pro Leu Pro Xaa Gly Trp Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa

<400> 6  
Gly Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Glu Arg Thr His Thr Asp Gly Arg  
1 5 10 15  
Ile Phe Tyr Ile Asn His Asn Ile Lys Arg Thr Gln Trp Glu Asp Pro  
20 25 30

Arg Leu Glu Asn Val Ala  
35

<210> 7  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

Gly Arg Leu Pro Pro Gly Trp Glu Arg Arg Thr Asp Asn Phe Gly Arg  
1 5 10 15  
Thr Tyr Tyr Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Trp Lys Arg Pro  
20 25 30  
Thr Leu Asp Gln Thr Glu  
35

<210> 8  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 8

Gly Glu Leu Pro Ser Gly Trp Glu Gln Arg Phe Thr Pro Glu Gly Arg  
1 5 10 15  
Ala Tyr Phe Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Thr Trp Val Asp Pro  
20 25 30  
Arg Arg Gln Gln Tyr Ile  
35

<210> 9  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 9

Gly Pro Leu Pro Ser Gly Trp Glu Met Arg Leu Thr Asn Thr Ala Arg  
1 5 10 15  
Val Tyr Phe Val Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Thr Trp Asp Asp Pro  
20 25 30  
Arg Leu Pro Ser Ser Leu  
35

<210> 10  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> *Homo sapien*

<400> 10

Leu Pro Ser Gly Trp Gly Trp Glu Gln Arg Lys Asp Pro His Gly Arg  
1 5 10 15  
Thr Tyr Tyr Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Thr Trp Glu Arg Pro  
20 25 30  
Gln Pro Leu Pro Pro Gly  
35

<210> 11  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 11  
 Gln Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Arg Arg Val Asp Asp Arg Arg Arg  
 1 5 10 15  
 Val Tyr Tyr Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Thr Trp Gln Arg Pro  
 20 25 30  
 Thr Met Glu Ser Val Arg  
 35

<210> 12  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 12  
 Gly Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Lys Arg Val Asp Ser Thr Asp Arg  
 1 5 10 15  
 Val Tyr Phe Val Asn His Asn Thr Lys Thr Thr Gln Trp Glu Asp Pro  
 20 25 30  
 Arg Thr Gln Gly Leu Gln  
 35

<210> 13  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 13  
 Glu Pro Leu Pro Glu Gly Trp Glu Ile Arg Tyr Thr Arg Glu Gly Val  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Phe Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Thr Phe Lys Asp Pro  
 20 25 30  
 Arg Asn Gly Lys Ser Ser  
 35

<210> 14  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (3)...(3)  
 <223> Xaa = any amino acid

<400> 14  
 Pro Pro Xaa Tyr  
 1

<210> 15  
 <211> 6

```

<212> PRT
<213> Homo sapien

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = Serine or Threonine

<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Proline, Alanine or Glycine

<400> 15
Xaa Pro Pro Pro Xaa Tyr
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 16
Thr Pro Pro Pro Ala Tyr
1 5

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Leucine or Methionine

<400> 17
Pro Ala Asp Thr Pro Pro Pro Ala Tyr Xaa Pro Pro Pro Asp
1 5 10

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 18
Thr Pro Pro Pro Gly Tyr
1 5

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapien

<220>
<221> VARIANT

```



```

<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Isoleucine or Leucine

<400> 19
Thr Pro Pro Pro Gly Tyr Xaa Ser Glu Asp Gly
1          5          10

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 20
Glu Leu Glu Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met
1          5          10

<210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 21
Gly Pro Glu Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Arg Leu Ser Pro
1          5          10

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 22
Pro Ala Asp Thr Pro Pro Pro Ala Tyr Leu Pro Pro Glu Asp
1          5          10

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 23
Pro Ala Asp Thr Pro Pro Pro Ala Tyr Met Pro Pro Asp Asp
1          5          10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 24
Ile Pro Glu Thr Pro Pro Pro Gly Tyr Ile Ser Glu Asp Gly
1          5          10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT

```

```

<213> Homo sapien

<400> 25
Ala Gly Leu Thr Pro Pro Pro Gly Tyr Leu Ser Glu Asp Gly
1           5           10

<210> 26
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 26
Leu Pro Ser Gly Trp Glu Gln Arg Lys Asp Pro His Gly Arg Thr Tyr
1           5           10           15
Tyr Val Asp His Asn Thr Arg Thr Thr Trp Glu Arg Pro Gln Pro
20           25           30
Leu Pro Pro Gly Trp Glu
35

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 27
Pro Ala Asp Thr Pro Pro Pro Ala His Leu Pro Pro Glu Asp
1           5           10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 28
His Pro Gly Thr Pro Pro Pro Pro Tyr Thr Val Gly Pro Gly
1           5           10

<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 29
Ile Pro Gly Thr Pro Pro Pro Asn Tyr Asp Ser Leu Arg Leu
1           5           10

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 30
Ile Pro Gly Thr Pro Pro Pro Asn His Asp Ser Leu Arg Leu
1           5           10

```



<210> 32  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<400> 32  
 Gly Phe Arg Trp Lys Leu Ala His Phe Arg Tyr Leu Cys Gln Ser Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Pro Ser His Val Lys Ile Asn Val Ser Arg Gln Thr Leu Phe  
 20 25 30  
 Glu Asp Ser Phe Gln Gln Ile Met Ala Leu Lys Pro Tyr Asp Leu Arg  
 35 40 45  
 Arg Arg Leu Tyr Val Ile Phe Arg Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Gly  
 50 55 60  
 Gly Leu Ala Arg Glu Trp Phe Phe Leu Leu Ser His Glu Val Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Pro Met Tyr Cys Leu Phe Glu Tyr Ala Gly Lys Asn Asn Tyr Cys Leu  
 85 90 95  
 Gln Ile Asn Pro Ala Ser Thr Ile Asn Pro Asp His Leu Ser Tyr Phe  
 100 105 110  
 Cys Phe Ile Gly Arg Phe Ile Ala Met Ala Leu Phe His Gly Lys Phe  
 115 120 125  
 Ile Asp Thr Gly Phe Ser Leu Pro Phe Tyr Lys Arg Met Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 Lys Leu Thr Ile Lys Asp Leu Glu Ser Ile Asp Thr Glu Phe Tyr Asn  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ile Trp Ile Arg Asp Asn Asn Ile Glu Glu Cys Gly Leu Glu  
 165 170 175  
 Met Tyr Phe Ser Val Asp Met Glu Ile Leu Gly Lys Val Thr Ser His  
 180 185 190  
 Asp Leu Lys Leu Gly Gly Ser Asn Ile Leu Val Thr Glu Glu Asn Lys  
 195 200 205  
 Asp Glu Tyr Ile Gly Leu Met Thr Glu Trp Arg Phe Ser Arg Gly Val  
 210 215 220  
 Gln Glu Gln Thr Lys Ala Phe Leu Asp Gly Phe Asn Glu Val Val Pro  
 225 230 235 240  
 Leu Gln Trp Leu Gln Tyr Phe Asp Glu Lys Glu Leu Glu Val Met Leu  
 245 250 255  
 Cys Gly Met Gln Glu Val Asp Leu Ala Asp Trp Gln Arg Asn Thr Val  
 260 265 270  
 Tyr Arg His Tyr Thr Arg Asn Ser Lys Gln Ile Ile Trp Phe Trp Gln  
 275 280 285  
 Phe Val Lys Glu Thr Asp Asn Glu Val Arg Met Arg Leu Leu Gln Phe  
 290 295 300  
 Val Thr Gly Thr Cys Arg Leu Pro Leu Gly Gly Phe Ala Glu Leu Met  
 305 310 315 320  
 Gly Ser Asn Gly Pro Arg Asn Ser Gln Lys Phe Cys Ile Glu Lys Val  
 325 330 335  
 Gly Lys Asp Thr Trp Leu Pro Arg Ser His Thr Cys Phe Asn Arg Leu  
 340 345 350  
 Asp Leu Pro Pro Tyr Lys Ser Tyr Glu Gln Leu Lys Glu Lys Leu Leu  
 355 360 365  
 Phe Ala Ile Glu Glu Thr Glu Gly Phe Gly Gln Glu  
 370 375 380

# 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、標的タンパク質とのユビキチン (Ub) ライゲーションの一般的機構を示す図である。ユビキチン化は、ユビキチンカスケードにおけるユビキチンモノ

マーの酵素1 (E1) へのATP依存性トランスファーにより開始される。E1でのユビキチン活性化の後、ユビキチンのユビキチン担体タンパク質 (E2) へのトランスファーが起こる。ユビキチンの標的タンパク質へのトランスファーはユビキチンリガーゼ (E3の) が仲介する。

#### 【図 2】

図2は、BMPによる Smad1分解の誘導を示すウェスタンブロットである。示したように、BMPおよび/またはLLF (Leu-Leu-Phe、プロテアソーム阻害剤) を用いた処理後の、トランスフェクトした細胞中の標識した Smad1のレベルを表す。

#### 【図 3】

図3は、Smad1ユビキチン化を示すウェスタンブロットである。示したように、HA標識した Smad1を発現する COS細胞を、BMP、LLFおよび/またはユビキチン (Ub) の1以上を用いて処理した。細胞を溶解し、Smad1を免疫沈降した。示したように、ウェスタンブロットを、抗HAおよび抗ユビキチン抗体を用いてプローブした。

#### 【図 4】

図4は、WWP1.1と Smad1のPYモチーフとの結合を示すオートラジオグラムである。トランスフェクトしていない COS細胞 (COS) 、またはHAタグ付けした Smad1もしくは変異PYモチーフを有する改変 Smad1 (Smad1\*) を用いてトランスフェクトした COS細胞を、溶解した。Smad1を免疫沈降し、WWP1.1 WWドメインの<sup>32</sup>P標識 GST融合タンパク質とともにインキュベートした。次いで、示したように、結合したWWP1.1をオートラジオグラフにより検出した。

#### 【図 5】

図5A~5DはPYモチーフペプチドとWWP1 WWドメインペプチドとの結合を示すグラフである。4つのGST融合タンパク質をアッセイした：GST-WWP1.1 (図5A) 、GST-WWP1.2 (図5B) 、GST-WWP1.3 (図5C) およびGST-WWP1.4 (図5D) 。それぞれのパネルに、GST単独との結合も示した (示したように、網掛けしたカラム) 。WWドメインペプチドを、示した受容体コーティング濃度にてポリスチレンプレート上にコートし、BSAを用いてブロックした。次いで、ビオチン化PYモチーフペプチド (Nedd、突然変異体NeddおよびWBP1) を示した通り加えた。結合は時間分解

蛍光アッセイを用いて評価し、結合活性 (cps) として示した。

#### 【図 6】

図6A～6DはSmad PYモチーフペプチドとWWP1 WWドメインペプチドとの結合を示すグラフである。4つのGST融合タンパク質をアッセイし、それぞれのグラフ：GST-WWP1.1、GST-WWP1.2、GST-WWP1.3およびGST-WWP1.4に示した。各パネルにおいて、GST単独との結合も示した（白四角）。WWドメインペプチドを、示した受容体コーティング濃度にてポリスチレンプレート上にコートし、BSAを用いてブロックした。次いで、ビオチン化PYモチーフペプチド（Smad7(図6A)；Smad6(図6B)；Smad2(図6C)およびSmad3(図6D)) を示した通り加えた。結合は時間分解蛍光アッセイを用いて評価し、cpsとして示した。

#### 【図 7】

図7A～7BはSmad PYモチーフペプチドとWWP1 WWドメインペプチドとの結合を示すグラフである。4つのGST融合タンパク質をアッセイし、それぞれのグラフ：GST-WWP1.1、GST-WWP1.2、GST-WWP1.3およびGST-WWP1.4に示した。WWドメインペプチドを、示した受容体コーティング濃度にてポリスチレンプレート上にコートし、BSAを用いてブロックした。次いで、ビオチン化PYモチーフペプチド（Smad5(図7A)；Smad1(図7B)) を示した通り加えた。時間分解蛍光アッセイを用いて結合を評価し、cpsとして示した。

#### 【図 8】

図8A～8Bは、増加する濃度のSmad7 PYモチーフペプチドとWWP1 WWドメインペプチドとの結合を示すグラフである。図8Aでは、4つのGST複合ペプチド（GST-WWP1.1、GST-WWP1.2、GST-WWP1.3およびGST-WWP1.4）との結合、ならびにRSP5.2 WWドメインとの結合を示した。WWドメインペプチドをポリスチレンプレート上に、示した受容体コーティング濃度にてコートし、BSAを用いてブロックした。次いで、ビオチン化PYモチーフペプチドを示した濃度にて加えた。時間分解蛍光アッセイを用いて結合を評価し、cpsとして示した。図8Bは、示した通り、Smad7 PYモチーフのWWP1.2およびWWP1.4に対するスキッチャード分析を表す。

#### 【図 9】

図9A～9Cは、カップリングユビキチン化アッセイ (coupled ubiquitination a

ssay) における E1 の活性化および活性を示すオートラジオグラムである。図 9A は、ユビキチン化 E1 (レーン 2) を示し、ここで、標識したユビキチンと共有結合で結合した E1 の存在は、指示された高分子量バンドにより示される。図 9B では、ユビキチン化 E1 および E2 (UBC5c) を示すバンドはレーン 1 に表され、そしてこのユビキチン化はレーン 2 (E1 の不存在下で実施した反応) またはレーン 3 (DTT の存在下で実施した反応) には存在しない。図 9C は、レーン 1 にユビキチン化 E1 および E2 (UBC7) を表し、このユビキチン化はレーン 2 (E1 の不存在下で実施した反応) またはレーン 3 (DTT の存在下で実施した反応) には存在しない。

#### 【図 10】

図 10A~10C は、カップリングユビキチンアッセイにおける HECT E3 リガーゼ WWP1 WW ドメインのユビキチン化を示すオートラジオグラムである。それぞれの図において、示した通り、標識ユビキチンの、残基 611-985 または 611-990 を含有する WWP1 HECT ドメイン中への取り込みを示す。反応は、示した通り、DTT の存在下または不存在下で実施した。ユビキチン化 WWP1-GST を矢印で示す。図 10A では E2 は UBC5c であり、図 10B では E2 は UBS7 であった。対照 (図 10C) は E2 の不存在下で実施した。

#### 【図 11】

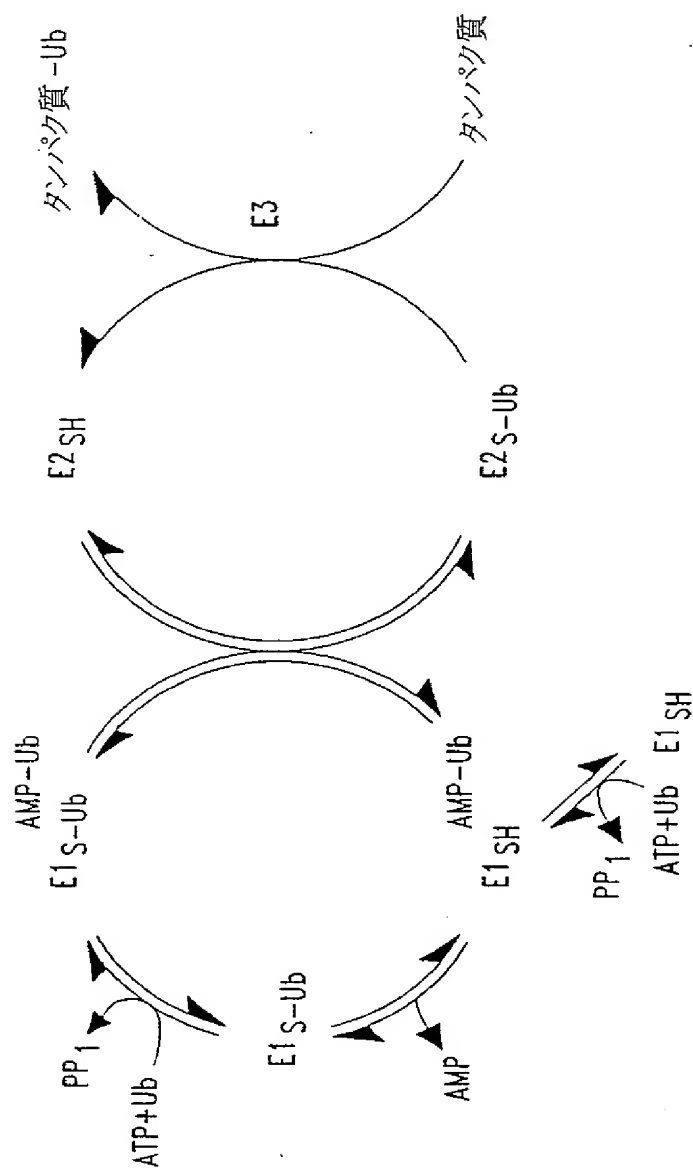
図 11A~11C は、カップリングユビキチンアッセイにおける HECT E3 リガーゼ WWP1 のユビキチン化を示すオートラジオグラムである。それぞれの図に、標識ユビキチンの残基 611-985 を含有する WWP1 HECT ドメイン中への取り込みを示す。また、ユビキチン E1 および E2 も示した。反応は、示した通り、DTT の存在下または不存在下で実施した。図 11A では E2 は UBC5c であり、図 11B では E2 は UBS7 であった。対照 (図 11C) は E2 の不存在下 (レーン 1) または E1 および E2 の不存在下 (レーン 2) で実施した。

#### 【図 12】

図 12A~12C は、カップリングユビキチンアッセイにおける HECT E3 リガーゼ WWP1 のユビキチン化の経時的変化を示すオートラジオグラムである。それぞれの図において、示した通り、標識ユビキチンの残基 611-985 を含有する WWP1 HECT ドメイン中への様々なインキュベーション時間後における取り込みを示す。図 12A で

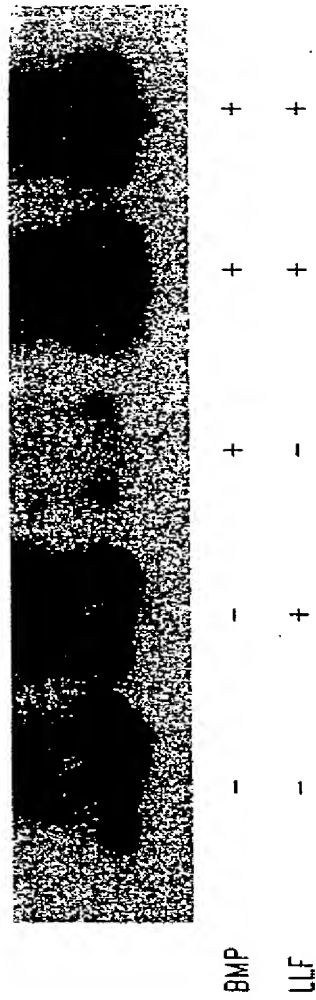
はE2はUBC5cであり、図12BではE2はUBS7であった。対照（図12C）はE2の不存在下（レーン1）で、60分間の反応にて実施した。

【図1】

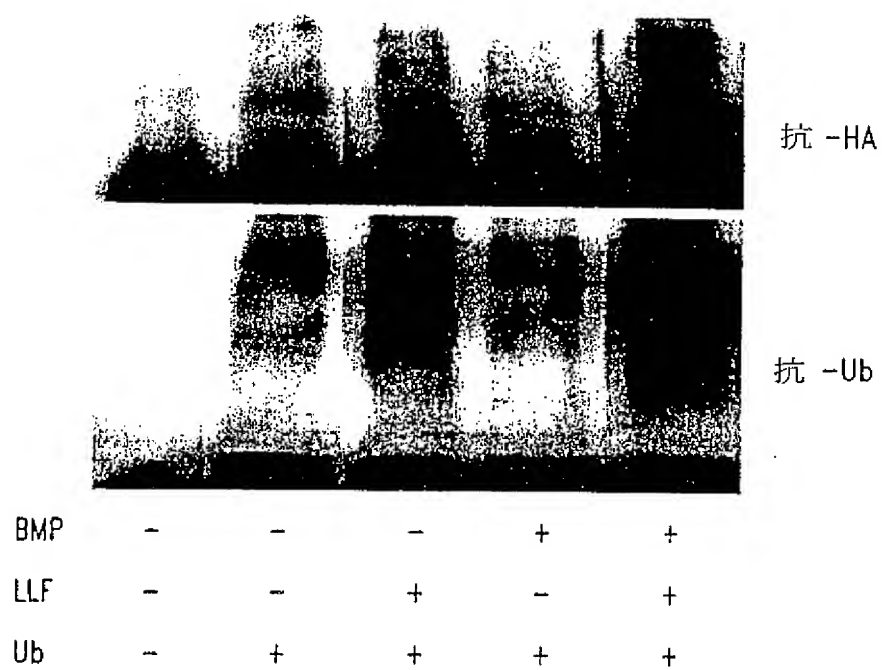




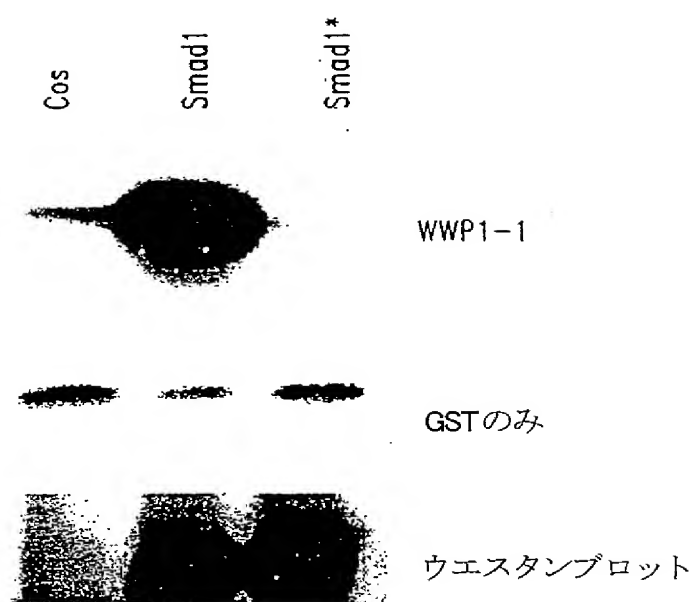
【図2】



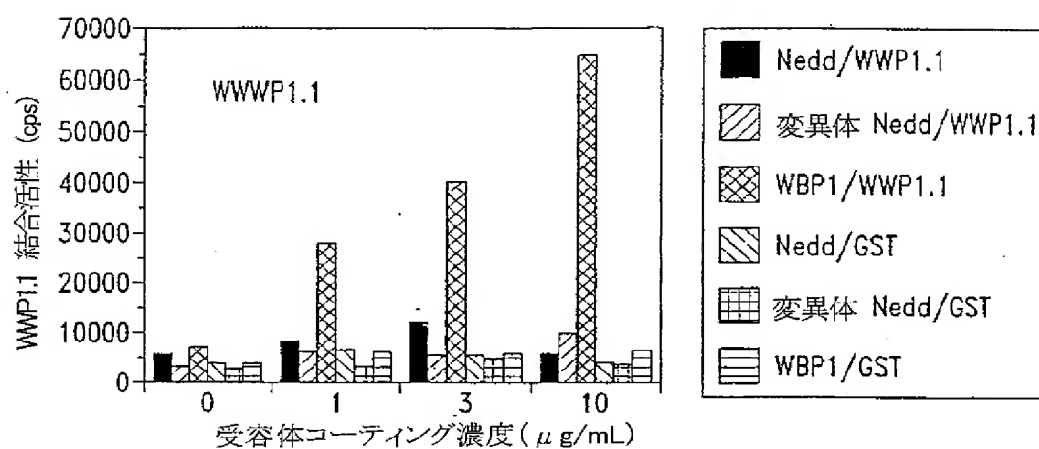
【図3】



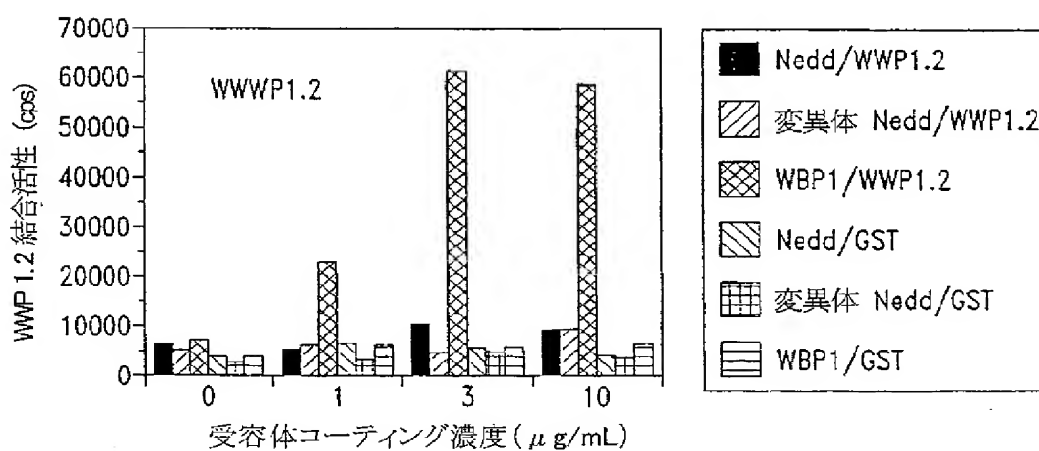
【図4】



【図5A・B】

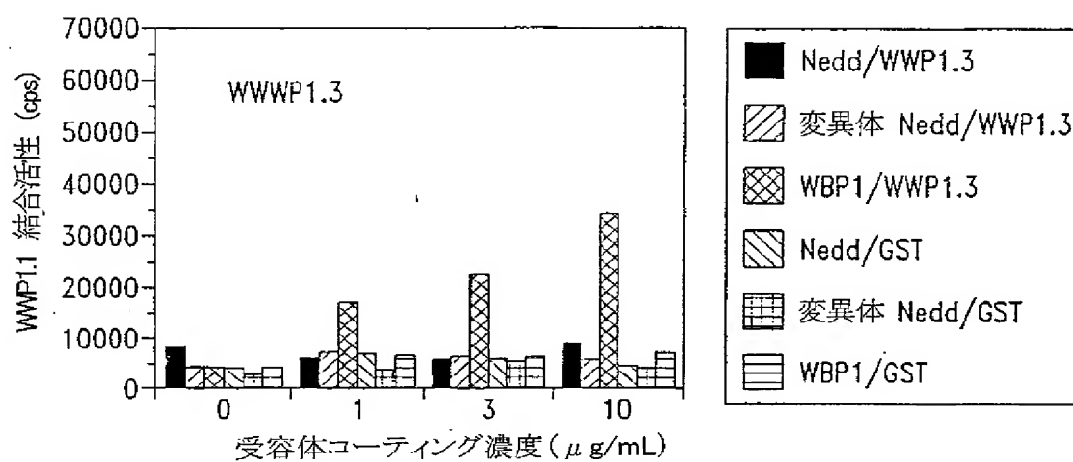


A

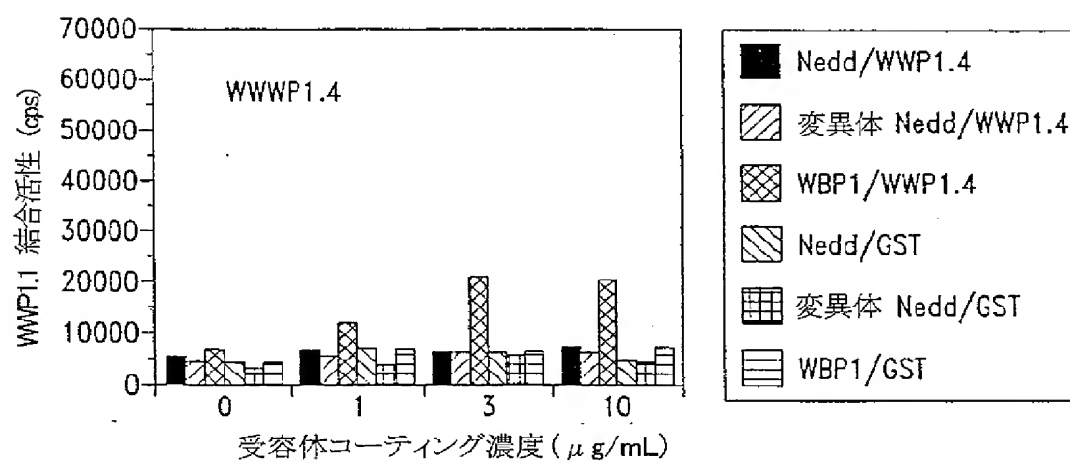


B

【図5C・D】

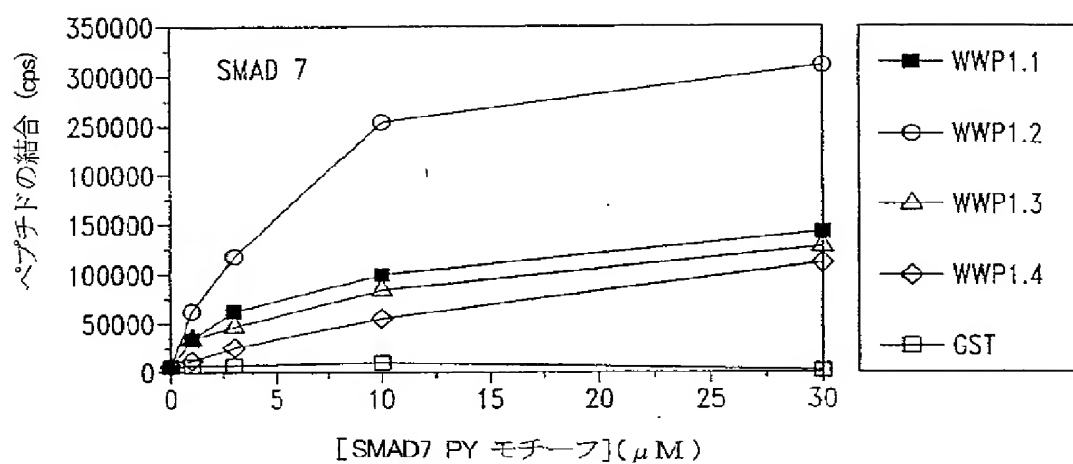


C

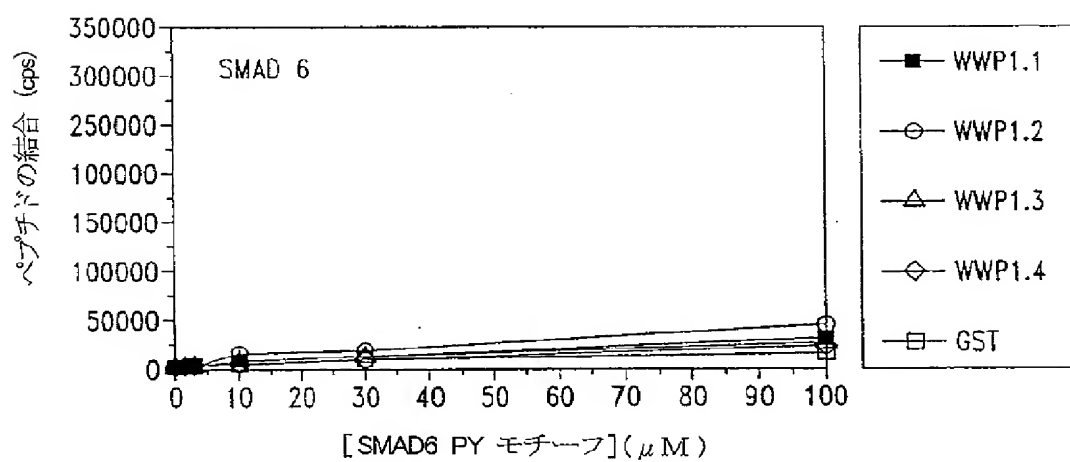


D

【図6A・B】

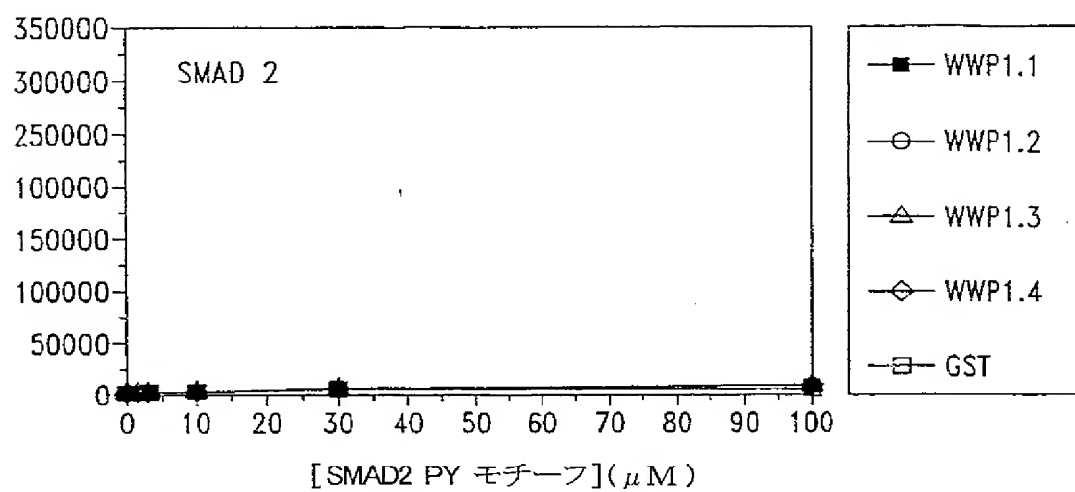
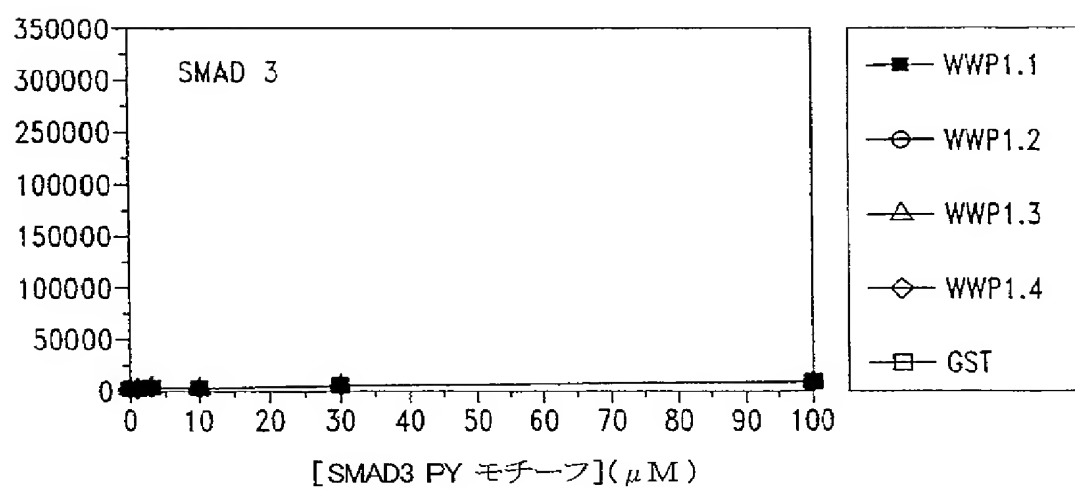


A

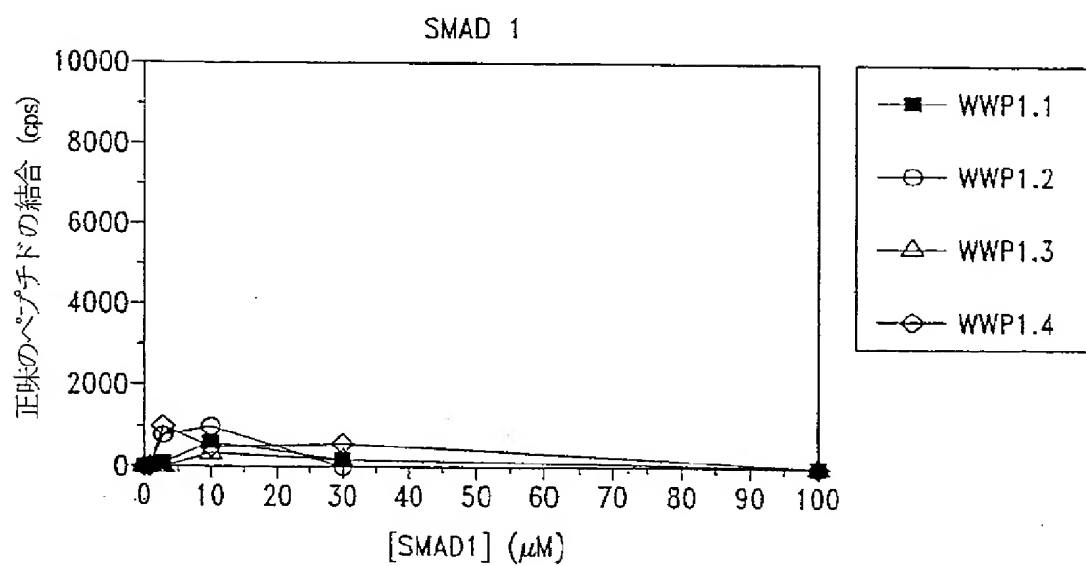
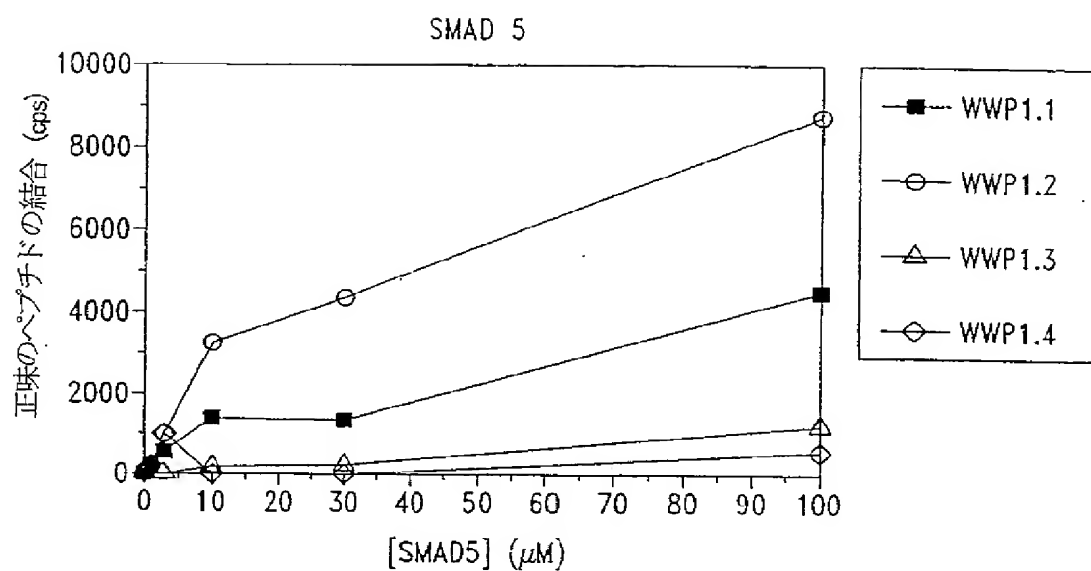


B

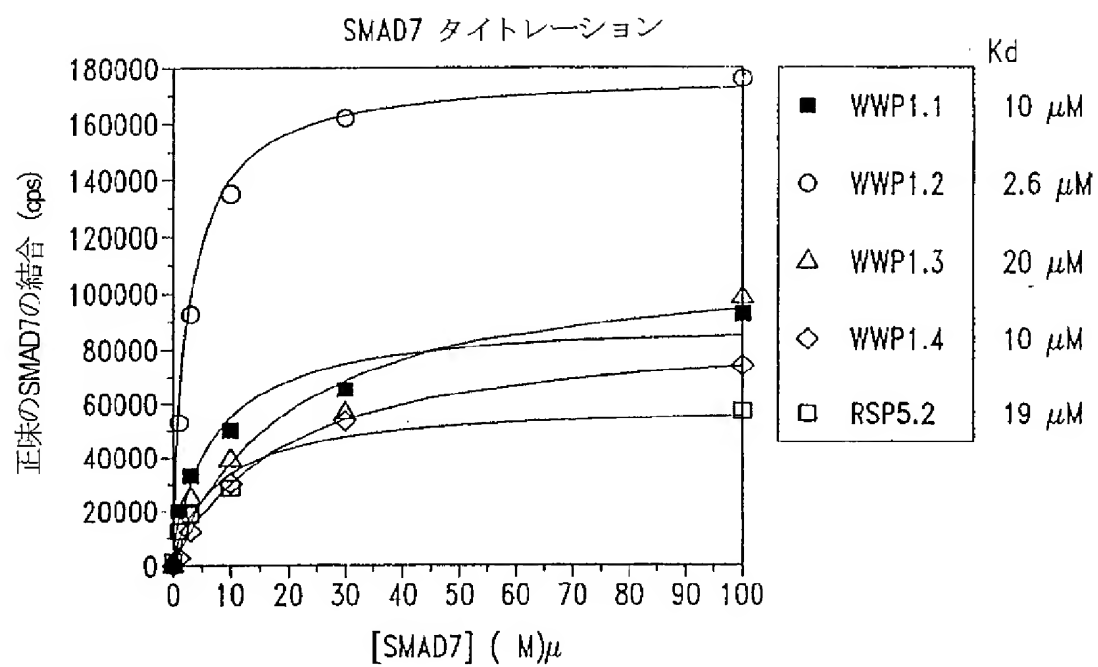
【図6C・D】

*C**D*

【図7】



【図 8 A】

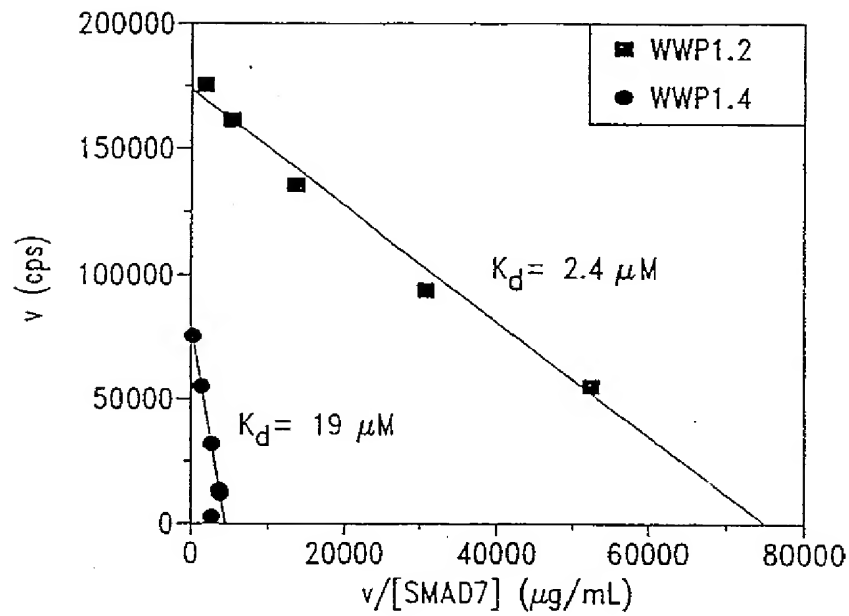


A

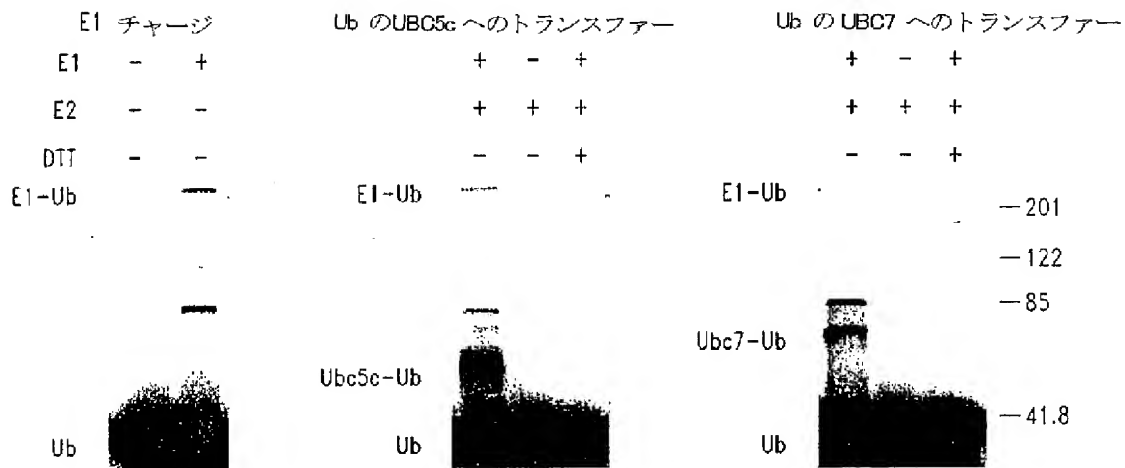


【図8B】

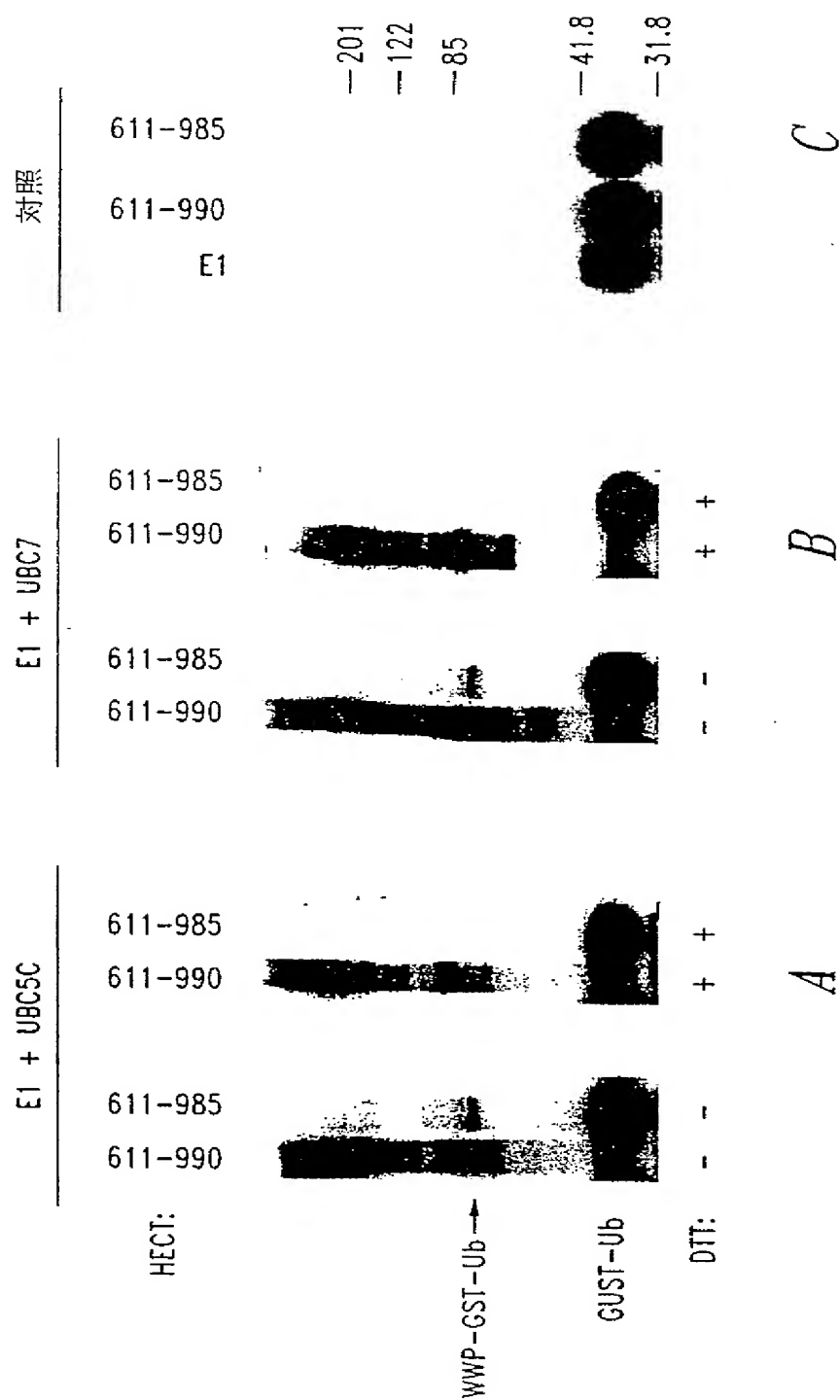
スキッチャード分析

*B*

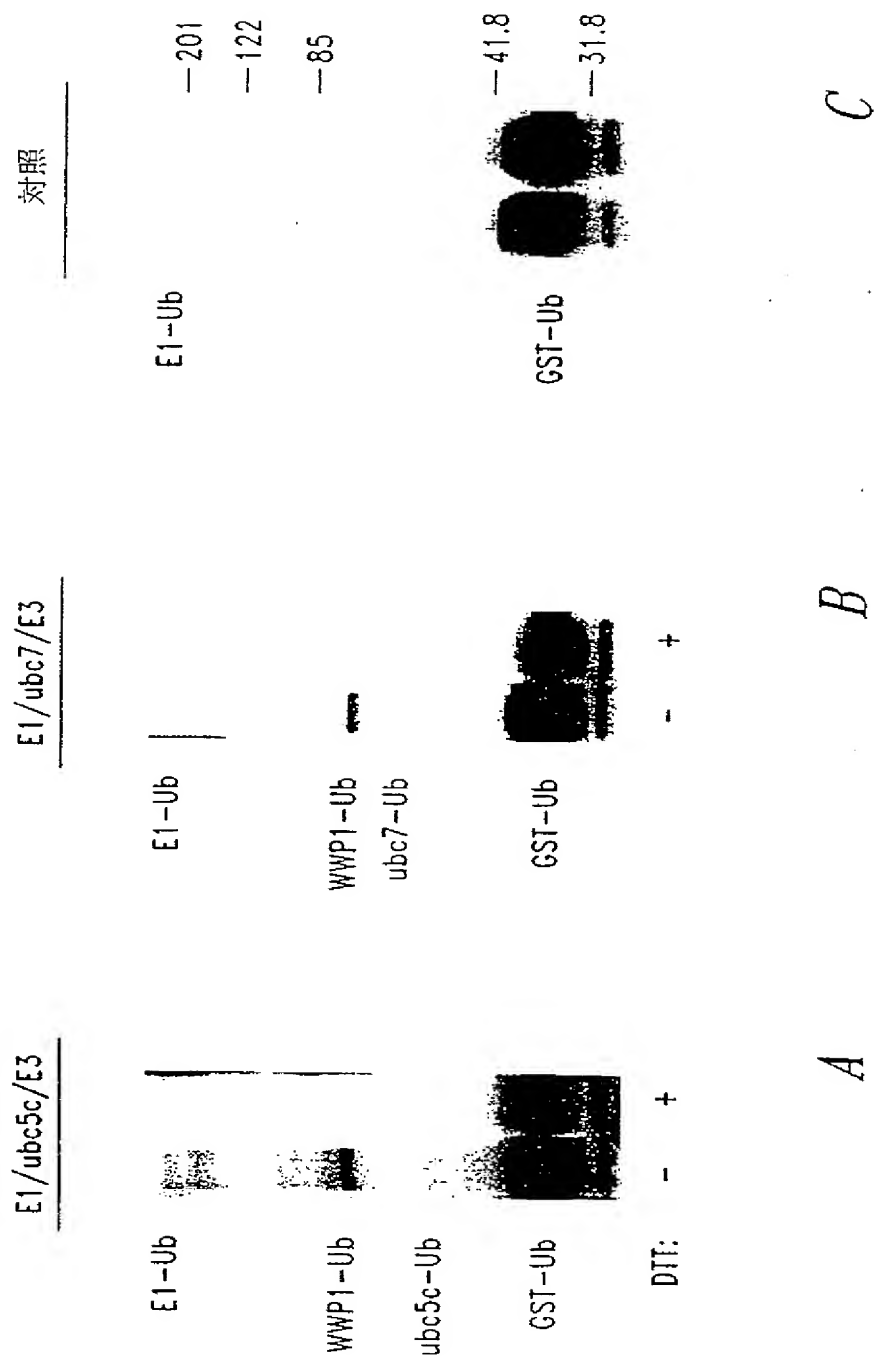
【図9】

*A**B**C*

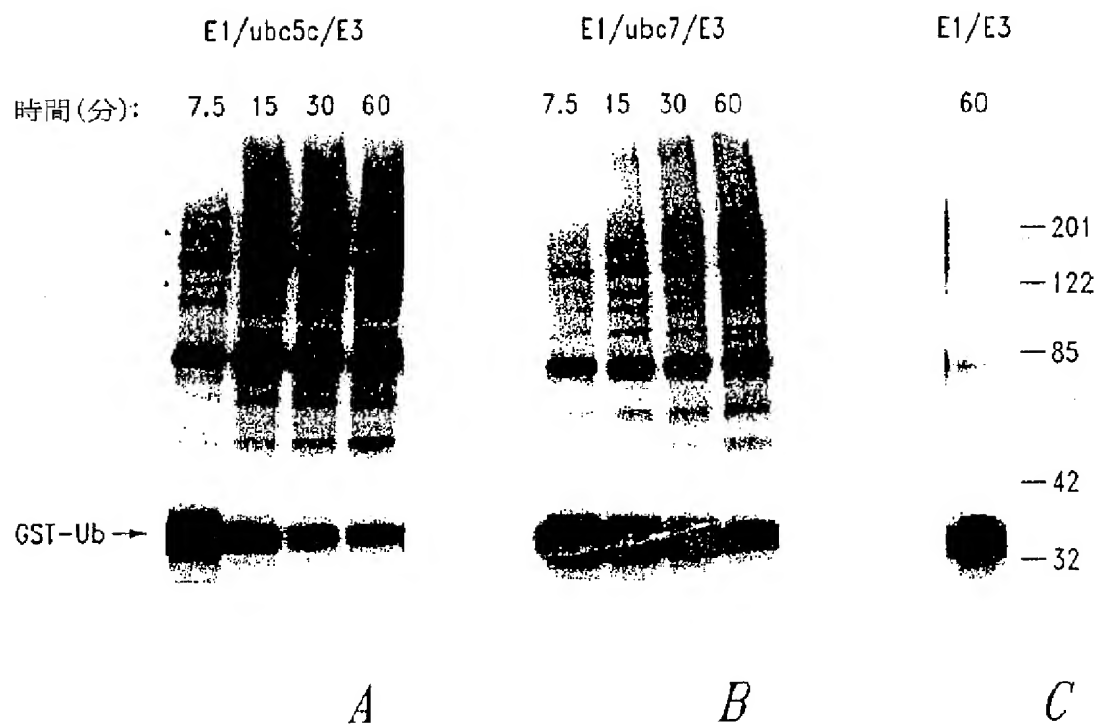
【図10】



【図 1 1】



【図12】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inter. Appl. No. PCT/US 00/23729
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 C12Q1/25 G01N33/50 G01N33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU HAITAO ET AL: "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation." NATURE (LONDON), vol. 400, no. 6745, 12 August 1999 (1999-08-12), pages 687-693, XP000960653 ISSN: 0028-0836 page 688, right-hand column, paragraph 2 page 688, right-hand column, paragraph 5	1-15
A	WO 99 01765 A (SLOAN KETTERING INST CANCER) 14 January 1999 (1999-01-14) the whole document --- -/-	1-54
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specimen) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 December 2000		Date of mailing of the international search report 18/12/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.  
PCT/US 00/23729

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MIYAZONO K: "Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: Functional roles of Smad proteins." BONE (NEW YORK), vol. 25, no. 1, July 1999 (1999-07), pages 91-93, XP000964877</p> <p>Second Joint Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research and the International Bone and Mineral Society; San Francisco, California, USA; December 1-6, 1998</p> <p>ISSN: 8756-3282</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-54
A	<p>HELDIN ET AL: "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 390, 4 December 1997 (1997-12-04), pages 465-471, XP002110963</p> <p>ISSN: 0028-0836</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-54

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 44-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

Continuation of Box I.1

Rule 39.I(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInter:      nal Application No  
PCT/US 00/23729

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD 9901765      A	14-01-1999	AU      8281398 A	25-01-1999



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/15	Z C C	G 0 1 N 33/15	Z C C Z
33/543	5 1 1	33/543	5 1 1 A
	5 1 5		5 1 5 A
33/566		33/566	
33/58		33/58	Z
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, C A, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, K E, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, R U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	クシイ, ウェイリン アメリカ合衆国 92130 カリフォルニア 州, サンディエゴ, ルエッテ デ マー 5375		
(72)発明者	ムレイ, ブライオン, ダブリュ. アメリカ合衆国 92106 カリフォルニア 州, サンディエゴ, ナルシッサス ドライ ブ 2685		
(72)発明者	マーキュリオ, フランク, エム. アメリカ合衆国 92014 カリフォルニア 州, デル マー, カミニト ヴァードッグ 2707		
F ターム (参考)	2G045 CB01 DA36 FB03 FB05 FB07 4C084 AA16 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA66 NA14 ZB11 ZB26 ZC42		